

**Untersuchungen zur
XylR-vermittelten Regulation des Xylose-Operons
und phänotypischen Heterogenität
in *Bacillus megaterium***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Sarah Wienecke
aus Helmstedt

1. Referent : Professor Dr. Dieter Jahn
2. Referentin: Privatdozentin Dr. Simone Bergmann
eingereicht am: 07.12.2016
mündliche Prüfung (Disputation) am: 19.01.2017

Druckjahr 2017

VORVERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Münch, K. M., Müller, J., Wienecke, S., Bergmann, S., Heyber, S., Biedendieck, R., Münch, R. & Jahn, D. (2015). Polar fixation of plasmids during recombinant protein production in *Bacillus megaterium* results in population heterogeneity. *Appl Environ Microb*, 81(17), 5976–5986.

Tagungsbeiträge:

Wienecke, S., Biedendieck, R. & Jahn, D. (2016) *In vitro* analysis of xylose repressor XylR from *Bacillus megaterium*. VAAM-Jahrestagung, Jena, Germany. (Poster)

Wienecke, S., Münch, K., Münch, R., Biedendieck, R. & Jahn, D. (2014). Phenotypic heterogeneity during heterologous protein production in *Bacillus megaterium*. VAAM-Jahrestagung, Dresden, Germany. (Poster)

Münch, K., Wienecke, S., Münch, R., Biedendieck, R. & Jahn, D. (2014). Phenotypic heterogeneity during heterologous protein production in *Bacillus megaterium*. SPP 1617 Progress report meeting / International Conference, Kloster Irsee, Germany. (Poster)

Wienecke, S., Münch, K., Heyber, S., Münch, R., Biedendieck, R. & Jahn, D. (2013). Analysis of phenotypic heterogeneity during heterologous protein production in *Bacillus megaterium*. SPP 1617 Progress report meeting, Kloster Banz, Germany. (Vortrag)

Münch, R., Biedendieck, R., Münch, K., Heyber, S., Wienecke, S., Klein, J. & Jahn, D. (2012). Phenotypic heterogeneity during heterologous protein production in *Bacillus megaterium*. SPP Kick-Off Meeting, Kolpinghaus München, Germany. (Vortrag)

„Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker; er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt.“

Marie Curie

INHALTSVERZEICHNIS

Vorveröffentlichungen der Dissertation	3
Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	10
1. Einleitung.....	13
1.1 <i>Bacillus megaterium</i>	13
1.2 Das Xylose-Operon in <i>Bacillus megaterium</i>	14
1.2.1 Der Aufbau des Xylose-Operons in <i>Bacillus megaterium</i>	14
1.2.2 Die Regulation des Xylose-Operons in <i>Bacillus megaterium</i>	16
1.2.3 Der Transkriptionsregulator XylR aus <i>Bacillus megaterium</i>	18
1.3 Das <i>lac</i>-Operon und dessen Transkriptionsregulatoren aus <i>Escherichia coli</i>	20
1.4 Entwicklung und Etablierung eines Xylose-induzierbaren Expressionssystems für die rekombinante Proteinproduktion in <i>Bacillus megaterium</i>.....	25
1.5 Phänotypische Heterogenität.....	29
1.5.1 Ursachen für phänotypische Heterogenität	30
1.5.1.1 Stochastisches Rauschen, positive Feedbackschleifen und autokatalytische Genexpression eines Transporters	30
1.5.1.2 Ungleiche Verteilung von Zellkomponenten während der Zellteilung in Abhängigkeit von stochastischen Effekten und des Zellpolalters.....	36
1.5.2 Vorteile der phänotypischen Heterogenität.....	42
1.5.3 Phänotypische Heterogenität in verschiedenen Organismen	44
1.5.3.1 Persistenz in <i>Staphylococcus aureus</i>	45
1.5.3.2 Laktoseverwertung und Colicin-Produktion in <i>Escherichia coli</i>	46
1.5.3.3 Kompetenz, Sporulation, Kannibalismus, Motilität und Biofilmbildung in <i>Bacillus subtilis</i>	48
1.5.3.4 Heterologe Proteinproduktion in <i>Bacillus megaterium</i>	52

2. Zielsetzung	53
3. Material und Methoden	54
3.1 Geräte und Chemikalien	54
3.2 Bakterienstämme und Plasmide	57
3.3 Kulturmedien und Zusätze	59
3.3.1 Vollmedium für <i>Escherichia coli</i> und <i>Bacillus megaterium</i>	59
3.3.2 Minimalmedium M9 für <i>Escherichia coli</i>	60
3.3.3 Minimalmedium A5+4 für <i>Bacillus megaterium</i>	60
3.3.4 Medienzusätze.....	61
3.4 Mikrobiologische Techniken	62
3.4.1 Sterilisation	62
3.4.2 Plattenkulturen von Bakterien	62
3.4.3 Flüssigkulturen von Bakterien	62
3.4.4 Lagerung von Bakterien	62
3.4.5 Bestimmung der Zelldichte.....	63
3.5 Molekularbiologische Methoden.....	63
3.5.1 Herstellung und Transformation CaCl_2 -kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	63
3.5.2 Herstellung und Transformation von <i>Bacillus megaterium</i> -Protoplasten.....	64
3.5.3 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	66
3.5.4 Präparation genomischer DNA aus <i>Bacillus megaterium</i>	67
3.5.5 DNA-Konzentrationsbestimmung	68
3.5.6 DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	68
3.5.7 Reinigung von PCR-Amplifikaten	71
3.5.8 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	71
3.5.9 Agarose-Gelelektrophorese	71
3.5.10 Reinigung von DNA-Fragmenten	72
3.5.11 Ligation von DNA	72

3.5.12	DNA-Sequenzierung	72
3.5.13	Quantitative Real-Time-PCR	73
3.6	Rekombinante Proteinproduktion und dessen Analyse in <i>Bacillus megaterium</i>.....	76
3.6.1	Expression rekombinanter Gene in <i>Bacillus megaterium</i>	76
3.6.2	Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	76
3.6.3	Fluoreszenzmikroskopie	78
3.6.4	Fluoreszenz-Time lapse-Mikroskopie	78
3.6.5	Kultivierung im Mikrobioreaktorsystem	79
3.7	Rekombinante Proteinproduktion in <i>Escherichia coli</i> und Analysen der rekombinanten Proteine	80
3.7.1	Rekombinante Produktion von His-XylR _{B.meg} in <i>Escherichia coli</i> und affinitätschromatographische Reinigung.....	80
3.7.2	Rekombinante Produktion von Strep-XylR _{B.meg} in <i>Escherichia coli</i> und affinitätschromatographische Reinigung.....	82
3.7.3	Rekombinante Produktion von XylT _{B.meg} in <i>Escherichia coli</i> und Präparation der Gesamtzellproteine	84
3.7.4	Proteinanalyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	84
3.7.5	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BSA-Standardreihe	86
3.7.6	Western-Blot-Analyse	86
3.7.7	Analyse von geeigneten Pufferbedingungen für His-XylR _{B.meg} über Thermofluor- Analysen	87
3.7.8	Proteinanalyse mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Native PAGE)	89
3.7.9	Gelretardationsassay mit His-XylR _{B.meg} mit und ohne gebundener Xylose	90
3.7.9.1	Gelretardationsassay und Detektion der DNA mit Ethidiumbromid.....	91
3.7.9.2	Gelretardationsassay und Immunodetektion der DNA.....	93
3.7.10	DNaseI-Footprint von His-XylR _{B.meg} mit und ohne gebundener Xylose	96
3.7.11	Generierung von monoklonalen Antikörpern und Immunodetektion	101
4.	Ergebnisse und Diskussion	105
4.1	Analysen und Bindestudien mit dem gereinigten Xylose-Repressor XylR aus <i>Bacillus megaterium</i>.....	105

4.1.1	Heterologe Produktion des Fusionsproteins His-XylR _{B.meg} in <i>Escherichia coli</i> ...	106
4.1.2	Heterologe Produktion und affinitätschromatographische Reinigung des Xylose-Repressors mit unterschiedlichen Tags.....	107
4.1.3	Verbesserung der Stabilität und Löslichkeit von His-XylR _{B.meg} mittels Thermofluor-Assay	109
4.1.4	Heterologe Produktion und affinitätschromatographische Reinigung von His-XylR _{B.meg} mit und ohne Xylose in <i>Escherichia coli</i>	111
4.1.5	Analyse von His-XylR _{B.meg} in Abhängigkeit von Xylose mittels nativer PAGE	113
4.1.6	<i>In vitro</i> Bindestudien von His-XylR _{B.meg} mit und ohne gebundener Xylose mittels Gelretardationsanalysen	114
4.1.7	Modelle für die XylR-vermittelte Regulation des Xylose-Operons.....	121
4.1.8	<i>In vitro</i> Bindestudien mit gereinigtem His-XylR _{B.meg} mittels DNaseI-Footprint-Analysen	124
4.2	Untersuchungen zur phänotypischen Heterogenität während der rekombinanten Gfp-Produktion in <i>Bacillus megaterium</i>.....	131
4.2.1	Autokatalytische <i>xylT</i> -Expression im Xylose-Operon als Ursache für phänotypische Heterogenität.....	133
4.2.1.1	Analyse und Einfluss von Systemen ohne autokatalytische Genexpression des Transporters mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	135
4.2.1.2	Analyse des rekombinant produzierten XylT _{B.meg} in <i>Escherichia coli</i> C43(DE3) .	139
4.2.2	Repressor-Induktor Ungleichgewicht durch high-copy Plasmide als Ursache für phänotypische Heterogenität.....	141
4.2.2.1	Analyse und Einfluss von unterschiedlichen Induktor-Konzentrationen mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	142
4.2.2.2	Analyse und Einfluss von Plasmiden mit unterschiedlichen Replikationsursprüngen mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	144
4.2.2.3	Analyse und Einfluss einer <i>Bacillus megaterium xylR</i> -Muntante mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	152
4.2.3	Ungleiche Verteilung von Zellkomponenten während der Zellteilung als Ursache für phänotypische Heterogenität.....	154
4.2.3.1	Analyse und Einfluss der ungleichen Plasmidverteilung durch instabiles Gfp mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	155
4.2.3.2	Analyse und Einfluss der ungleichen XylR-Plasmid-Verteilung mittels Immunodetektion in fixierten <i>Bacillus megaterium</i> -Zellen.....	158
4.2.3.3	Analyse und Einfluss der ungleichen Plasmidverteilung mittels Time lapse	160

4.2.3.4	Analyse und Einfluss eines Plasmid-freien Systems durch genomische <i>gfp</i> -Integration mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	165
5.	Zusammenfassung	169
6.	Summary.....	170
7.	Ausblick.....	171
8.	Literaturverzeichnis	172
9.	Anhang	186
	Danksagung.....	192

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
ca.	circa
Cam	Chloramphenicol
Carb	Carbenicillin
CCD	ladungsgekoppeltes Bauteil (charge coupled device)
CDP	Dinatrium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5-chlorotricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan])-4-yl]-1-phenylphosphat
Cfp	blau fluoreszierendes Protein (cyan fluorescent protein)
CHES	2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure
Da	Dalton
DIG	Digoxigenin
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGfp	verbessertes grün fluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescent protein)
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
Ery	Erythromycin
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
EtOH	Ethanol

FACS	fluorescence-activated cell sorting
fw	vorwärts (forward)
g	Gramm
Gfp	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HTH	Helix-Turn-Helix
H ₂ O _{deion.}	deionisiertes Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
L	Liter
LB	Luria-Bertani
μ	Micro
m	Milli
MCS	multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
M _r	relative Molekülmasse
n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
OD _λ	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von λ nm
<i>ori</i>	Replikationsursprung (origin of replication)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCN	Plasmidkopienzahl (plasmid copy number)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglykol

PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
rcf	relative Zentripetalbeschleunigung (Relative centrifugal force)
RNase	Ribonuklease
ROK	Repressor, Open reading frame, Kinase
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
rv	rückwärts (reverse)
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SV	Säulenvolumen
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ü.N.	über Nacht
v/v	Volumenanteil pro Volumen (volume per volume)
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen (weight per volume)
x g	x Erdbeschleunigung
Yfp	gelb fluoreszierendes Protein (yellow fluorescent protein)

1. EINLEITUNG

1.1 *Bacillus megaterium*

Bacillus megaterium ist ein Gram-positives, apathogenes, stäbchenförmiges Bakterium. Es wächst aerob und gehört, wie die meisten Bakterien aus der Gattung *Bacillus*, zu den Endosporenbildnern. Die stäbchenförmigen Bakterien bilden aufgrund von aneinanderhaftenden Exopolysacchariden kettenartige Strukturen, was ein spezifisches Merkmal für *B. megaterium* darstellt.

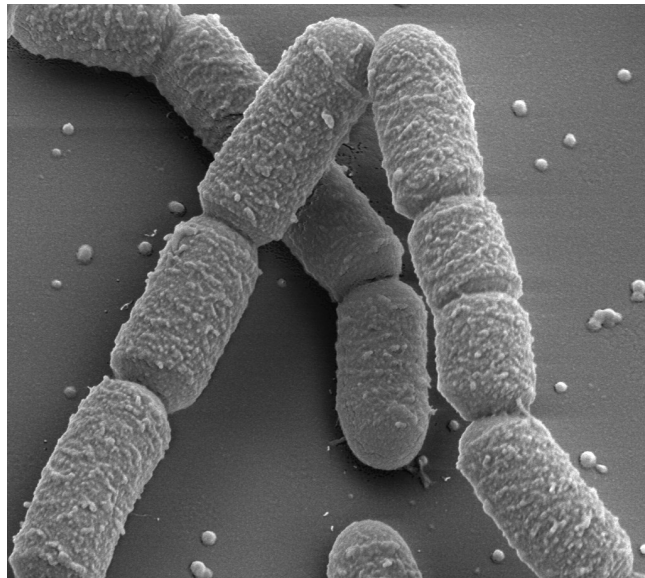


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *B. megaterium* Stäbchenketten (Rohde, M., HZI, Braunschweig, 2006).

Das Bakterium wurde im Jahr 1884 das erste Mal von De Bary beschrieben und erhielt seinen Namen aufgrund seiner enormen Größe im Verhältnis zu anderen Bakterien („megatherium“, griechisch: großes Biest) (De Bary, 1884). Im Vergleich zu *Escherichia coli* besitzt *B. megaterium* ein 100-faches größeres Volumen. Seine Stäbchen können eine Länge von bis zu 4 µm erreichen. Diese Tatsache macht *B. megaterium* für visuelle Untersuchungen zum Aufbau und Entwicklungsprozess seiner Sporen (Foerster & Foster, 1966; Gally *et al.*, 1991) sowie zur Synthese der Zellwand und die Lokalisation von Proteinen (Christie *et al.*, 2010; Vary, 1992; Vary *et al.*, 2007) interessant. Außerdem wurde *B. megaterium* schon vor vielen Jahren erfolgreich für Studien über den UV-Licht-induzierbaren lysogenen Zyklus von Bakteriophagen (Lwoff *et al.*, 1950; Lwoff & Siminovitch, 1951) und für die Entdeckung des bakteriellen Speicherstoffs Polyhydroxybuttersäure genutzt (Lemoigne *et al.*, 1950). Das ca. 5,1 Mbp-große Genom von *B. megaterium* wurde

2011 vollständig sequenziert. Es besitzt über 5000 Gene und einen GC-Gehalt von 38 % (Eppinger *et al.*, 2011). Der niedrige GC-Gehalt und einige andere oben beschriebene Merkmale ordnen *B. megaterium* dem Phylum Firmicutes zu (Priest *et al.*, 1988). Zu seinen natürlichen Habitaten gehören der Erdboden, aber auch Seewasser, Reisfelder und sogar Honig (Vary, 1994). Die Besiedelung dieser unterschiedlichen Lebensräume spiegelt sich in seiner Fähigkeit wider, zahlreiche C-Quellen verstoffwechseln zu können (Vary, 1994). Die Verstoffwechselung des Zuckers Xylose, die in natürlichen Habitaten als Bestandteil von Xylan und Hemicellulose vorkommt, wurde 1991 genauer in *B. megaterium* untersucht (Rygus *et al.*, 1991; Wilkie & Woo, 1977).

1.2 Das Xylose-Operon in *Bacillus megaterium*

1.2.1 Der Aufbau des Xylose-Operons in *Bacillus megaterium*

Rygus *et al.* identifizierten 1991 die Gene, die für die Verstoffwechselung des Zuckers Xylose in *B. megaterium* verantwortlich sind (Rygus *et al.*, 1991). Die Gene wurden mit Hilfe einer *Bacillus subtilis*-Mutante identifiziert, die einen defizienten Phänotyp in der Verstoffwechselung von Xylose zeigte. Diese Mutante wurde mit verschiedenen Vektoren transformiert, die als Insert Fragmente der genomischen DNA aus *B. megaterium* enthielten. Nach der Transformation besaßen wenige Klone wieder den ursprünglichen Phänotyp und waren in der Lage, Xylose als einzige C-Quelle zu verstoffwechseln. Die Mutation wurde durch die entsprechenden Gene der genomischen DNA aus *B. megaterium*, die in die Mutante eingebracht wurde, komplementiert. Nach der Sequenzierung des entsprechenden Vektors konnten zunächst zwei Gene, die für die Xylose-verstoffwechselnden Enzyme codieren, identifiziert werden (Rygus *et al.*, 1991). Das *xyIA*-Gen codiert für die Xylose-Isomerase, die die Umwandlung von Xylose zu Xylulose, und das *xyIB*-Gen für die Xylulose-Kinase, die die Phosphorylierung von Xylulose katalysiert. Das Produkt Xylulose-5-Phosphat kann dann in den Pentosephosphatweg eingeschleust und weiter verwertet werden. In Anwesenheit eines dritten Gens konnte nach Zugabe von Xylose eine erhöhte Transkription von *xyIAB* festgestellt werden, während die Transkription ohne Xylose stark reprimiert war. Die Abwesenheit dieses Gens hingegen führte zu einer konstitutiven Expression von *xyIAB*. Somit konnte gezeigt werden, dass das Produkt dieses Gens *xyIAB* auf Transkriptionsebene regulieren

konnte. Bei diesem Transkriptionsregulator handelte es sich um den Xylose-Repressor XylR (Rygus *et al.*, 1991; Rygus & Hillen, 1992). Das *xyIR*-Gen ist upstream und divergent zu den Strukturgenen *xyIAB* lokalisiert und unterliegt seiner negativen Autoregulation. Die Aufnahme der Xylose in die Zelle erfolgt über einen membranständigen Transporter, die Xylose-Permease. Das zugehörige *xyIT*-Gen wurde 1997 von Schmiedel *et al.* identifiziert und untersucht. Die Transkription des *xyIT*-Gens wird ebenfalls durch den Xylose-Repressor reguliert, wobei sich *xyIT* zusammen mit *xyIAB* im Xylose-Operon *xyIABT* befindet. Des Weiteren wurde ein interner Terminator zwischen *xyIA* und *xyIB* identifiziert, der die Transkription der nachfolgenden Gene *xyIB* und *xyIT* reguliert (Schmiedel *et al.*, 1997). Der Terminator führt dazu, dass die Transkription verringert oder abgebrochen wird. In Folge befindet sich auch weniger Xylulose-Kinase (XylB) und Xylose-Permease (XylT) in der Zelle. Dies scheint ein Schutzmechanismus der Zelle zu sein, da sich eine zu hohe Menge an XylB und XylT negativ auf das Wachstum der Zelle auswirken kann (Schmiedel *et al.*, 1997).

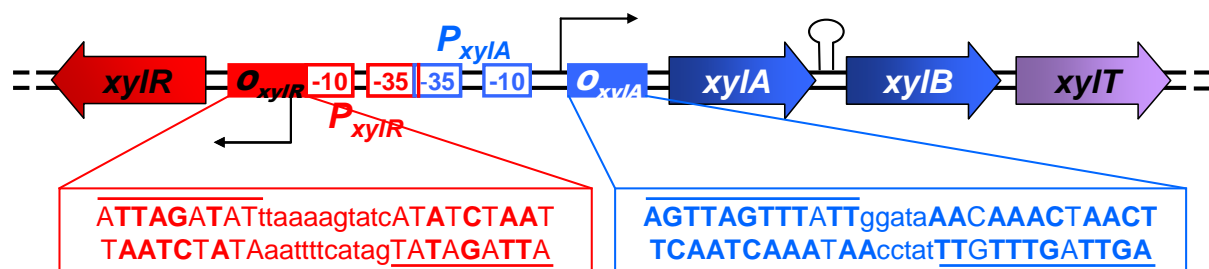


Abb. 2: Schematischer Aufbau des Xylose-Operons aus *B. megaterium*. Dargestellt ist das Xylose-Operon aus *B. megaterium* mit den Genen *xyIABT*, die für die Xylose-verstoffwechselnden Enzyme codieren. Das *xyIR*-Gen ist divergent zu *xyIABT* lokalisiert und codiert für den Xylose-Repressor XylR. Die Promotoren P_{xyIA} und P_{xyIR} sind ebenfalls divergent zueinander lokalisiert und überlappen in der -35-Region in einer Base. Die Operatorsequenzen sind als Ausschnitt hervorgehoben (O_{xyIR} und O_{xyIA}). Die palindromischen Strukturen in den Operatorsequenzen sind jeweils unterstrichen und in Großbuchstaben dargestellt. Die Kleinbuchstaben kennzeichnen die zentralen Nukleotide des Palindroms. Die Konsensussequenz ist durch fett gedruckte Buchstaben hervorgehoben. Die Transkriptionsstartpunkte sind durch schwarze Pfeile dargestellt. Der Terminator zwischen *xyIA* und *xyIB* ist als Loop dargestellt. Die Länge der Elemente gibt keine Rückschlüsse auf die Länge der jeweiligen Gene und regulatorischen Bereiche.

Abb. 2 zeigt den Aufbau des Xylose-Operons aus *B. megaterium*. Die *xyIABT*-Gene liegen unter der Kontrolle des *xyIA*-Promotors (P_{xyIA}). Divergent dazu ist der *xyIR*-Promotor und das *xyIR*-Gen lokalisiert. Die Promotoren wurden durch Primerextensionsanalysen identifiziert und überlappen in der -35-Region in einer Base (Rygus *et al.*, 1991). Wie die Abb. 2 schematisch zeigt, sind die beiden

Operatoren unterschiedlich weit von den entsprechenden Promotoren entfernt. Während der *xyIR*-Operator direkt an die -10-Region des *xyIR*-Promotors grenzt, ist der *xyIA*-Operator 7 bp vom *xyIA*-Promotor entfernt. Die Operatorsequenz von *xyIA* wurde bereits 1989 in *B. subtilis* durch *in vivo* Deletionsstudien identifiziert (Kreuzer *et al.*, 1989) und aufgrund großer Sequenzhomologie für *B. megaterium* postuliert (Scheler *et al.*, 1991). Zusätzlich konnte die in *B. subtilis* identifizierte Operatorsequenz *in vitro* mittels Footprint-Analysen bestätigt werden (Gärtner *et al.*, 1992). Die Sequenz vom *xyIR*-Operator in *B. megaterium* wurde aufgrund eines ähnlichen Aufbaus zum *xyIA*-Operator vorhergesagt (Rygus *et al.*, 1991; Scheler *et al.*, 1991). Die *xyIA*- und *xyIR*-Operatorsequenzen bestehen jeweils aus 29 Basenpaaren, die eine palindromische Struktur besitzen. Die palindromischen Strukturen sind im *xyIA*-Operator durch 5, im *xyIR*-Operator durch 11 zentrale Basenpaare getrennt (Abb. 2, hervorgehobener Ausschnitt). Palindromische Strukturen dienen oft als Bindestelle für Transkriptionsfaktoren.

Bisher konnten die postulierten *xyIA*- und *xyIR*-Operatorsequenzen für *B. megaterium* noch nicht *in vitro* als Bindestelle für den Xylose-Repressor XylR identifiziert werden. Während der Aufbau des Xylose-Operons sehr gut charakterisiert ist, fehlen bisher außerdem noch *in vitro* Studien des Transkriptionsregulators XylR und der XylR-vermittelten Regulation des Operons in *B. megaterium*.

1.2.2 Die Regulation des Xylose-Operons in *Bacillus megaterium*

Regulation auf Transkriptionsebene ist ein wichtiger Mechanismus, den Bakterien nutzen, um sich an ständig ändernde Umweltbedingungen anzupassen. Die Regulation führt zur Aktivierung und / oder Repression der Expression von Genen. Dadurch kann sich neben der mRNA auch die Proteinzusammensetzung in der Zelle, zum Beispiel von bestimmten Enzymen, ändern, so dass der Organismus angemessen auf die wechselnden Bedingungen reagieren kann. Dass Enzyme und Proteine je nach Bedarf in einer Zelle vorhanden sind, verschafft dem Bakterium Vorteile, da der Organismus dadurch Energie einsparen kann (Stoebel *et al.*, 2008). Ändert sich nun aber zum Beispiel die Nährstoffzusammensetzung in der Umgebung, müssen in der Zelle zeitnah Enzyme bereitgestellt werden, die die Aufnahme und Verstoffwechselung der neuen Nährstoffe veranlassen. Diese Art der Regulation wird

meist durch die verstärkte Transkription der entsprechenden Gene mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren gesteuert, die die Expression eines erheblichen Teils der Gene in Bakterien beeinflussen. Beispielsweise regulieren sieben verschiedene Transkriptionsfaktoren die Expression 50 % aller Gene in *E. coli* (Martínez-Antonio & Collado-Vides, 2003). Transkriptionsfaktoren können in die Transkriptionsinitiation eingreifen und dabei als Aktivator oder Repressor dienen, so dass mRNA synthetisiert oder deren Synthese reprimiert wird.

Die Transkriptionsinitiation beschreibt den Beginn der mRNA-Synthese, die mit der Bindung der Promotorregion durch die RNA-Polymerase beginnt. Für die Bindung an die Promotorregion muss die RNA-Polymerase als aktiver Komplex vorliegen, der aus Core-Enzym und der σ -Untereinheit besteht. Die σ -Untereinheit übernimmt eine wichtige Funktion bei der Promotor-Erkennung und führt die RNA-Polymerase an die entsprechende DNA-Sequenz (Wösten, 1998). Durch die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor entsteht zunächst der sogenannte geschlossene Komplex und schließlich der offene Komplex, in dem das Aufschmelzen der DNA stattfindet. Es folgt das Einbauen erster Nukleotide (Initiationskomplex) und das Verlassen des Promotors, wodurch die Elongation beginnt (Record *et al.*, 1996).

Aktivatoren können die Bildung des geschlossenen Komplexes fördern. Sie kommen oft an schwachen Promotoren zum Einsatz und steigern die Affinität der RNA-Polymerase zum Promotor. Sie binden an den sogenannten Operator und interagieren mit verschiedenen Untereinheiten der RNA-Polymerase, wodurch diese an den Promotor geführt wird. Ein Operator ist ein bestimmter DNA-Abschnitt in einem Operon, der in der Nähe oder innerhalb des Promotors liegt und als Bindestelle für Regulatorproteine wie Aktivatoren dienen kann. Das bekannteste Beispiele für diese Art von Aktivator ist das Katabolit-Kontroll-Protein (Catabolite Response Protein, CRP) am *lac*-Promotor aus *E. coli* (Ebright, 1993). Andere Aktivatoren sind in der Lage, die DNA in eine räumlich günstigere Position zu bringen, so dass die Bindung von RNA-Polymerase und Promotor erleichtert wird. Diese Art der Aktivierung findet man oft an Promotoren, bei denen die -10- und die -35-Region nicht optimal zueinander liegen und die Bindung an den Promotor dadurch erschwert wird (Heldwein & Brennan, 2001; Brown *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zu den Aktivatoren, die den geschlossenen Komplex fördern, können Repressoren bereits die Bildung des geschlossenen, aber auch des offenen oder des Initiationskomplexes verhindern. Die meisten Repressoren inhibieren schon die

Bildung des geschlossenen Komplexes. Bei dieser Art der Repression bindet der Repressor an den Operator, wodurch es zu einer sterischen Behinderung der Bindung von RNA-Polymerase und Promotor kommt. Diese Art der Repression kommt oft an Promotoren vor, bei denen eine Überlappung des Operators (Repressorbindestelle) mit dem Promotor (RNA-Polymerasebindestelle) vorhanden ist (Schlax *et al.*, 1995). Es gibt aber auch Repressoren, die an verschiedene Operatoren binden, die nicht mit dem Promotor überlappen. Diese Repressoren können miteinander interagieren, was zur Bildung von DNA-Loops führen kann, wodurch die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor verhindert wird (Choy & Adhya, 1996). Des Weiteren können Repressoren als Anti-Aktivatoren wirken, indem sie an die Aktivatoren binden, die daraufhin nicht mehr an den Operator binden können und ihre Wirkung verlieren (Valentin-Hansen *et al.*, 1996).

Da Aktivatoren und Repressoren nur unter bestimmten Bedingungen die Transkription regulieren sollen, muss auch ihre Aktivität reguliert werden. Dies geschieht oft über Liganden, die auch als Induktor bezeichnet werden, da sie „induzierend“ auf die Transkription wirken. Durch Anwesenheit eines Induktors können Repressoren inaktiviert und Aktivatoren aktiviert werden, wohingegen die Abwesenheit des Induktors zur Aktivierung des Repressors bzw. zur Inaktivierung des Aktivators führt. Die Induktoren binden meist an den entsprechenden Transkriptionsfaktor, der dann für die Regulation der Expression von Genen verantwortlich ist, deren Genprodukte für den Transport und die Verstoffwechselung dieses Induktors benötigt werden. Dieser Mechanismus ermöglicht so Bakterien die angemessene und erforderliche Anpassung an entsprechende Bedingungen und den jeweiligen Lebensraum (Xu & Matthews, 2009).

1.2.3 Der Transkriptionsregulator XylR aus *Bacillus megaterium*

Das *xylR*-Gen, das für den Xylose-Repressor codiert, wurde 1991 im Genom von *B. megaterium* identifiziert (Rygus *et al.*, 1991). Der Xylose-Repressor XylR aus *B. megaterium* reguliert die Transkription der Gene *xylA*, *xylB* und *xylT* aus dem Xylose-Operon, dessen Genprodukte für die Verstoffwechselung von Xylose verantwortlich sind, in dem er an den Operator des Promotors P_{xylA} bindet. Außerdem unterliegt das *xylR*-Gen seiner eigenen negativen Autoregulation. Der natürliche Induktor Xylose bindet an den Repressor, der daraufhin inaktiv wird, so dass die

entsprechenden Gene transkribiert werden können. Die Abwesenheit von Xylose führt hingegen zur Reprimierung der *xyl*-Gene. Neben Xylose kann auch Glukose an den Xylose-Repressor binden, der daraufhin unzugänglich für Xylose wird und somit nicht inaktiviert werden kann (Kraus *et al.*, 1994; Dahl *et al.*, 1995).

XylR_{*B.meg*} ist ein aus 388 Aminosäuren bestehendes Protein mit einer relativen molekularen Masse von 42500. Eine palindromische Sequenz im *xylA*- und *xylR*-Operator, die durch wenige zentrale Basenpaare unterbrochen wird, wurde als Bindestelle für XylR aus *B. megaterium* vorhergesagt. Die Sequenz AGTTAGTTTATTGGATAAACAACTAACT wurde für den *xylA*-Operator vorhergesagt, die Sequenz ATTAGATATTTAAAAGTATCATATCTAAT für den *xylR*-Operator, wobei die palindromischen Strukturen unterstrichen sind (Scheler *et al.*, 1991). In *B. subtilis* konnte mittels Gelretardationsanalysen bereits *in vitro* gezeigt werden, dass das halbseitige Palindrom im *xylA*-Operator nicht mehr als Bindestelle für XylR fungieren kann (Gärtner *et al.*, 1992). Solche Beobachtungen lassen vermuten, dass der aktive Xylose-Repressor als Homodimer oder Multimer oligomerisiert sein könnte (Gärtner *et al.*, 1992). Da die Aminosäuresequenzen des Xylose-Repressors von *B. subtilis* und *B. megaterium* zu 70 % identisch sind, wurde das Oligomerisierungsverhalten auch für den Xylose-Repressor aus *B. megaterium* vermutet (Scheler *et al.*, 1991). Aufgrund von Sequenzanalysen wurde der Xylose-Repressor in die Familie der ROK-Transkriptionsfaktoren eingeordnet (Dahl *et al.*, 1995). Diese Proteinfamilie enthält unter anderem weitere Xylose-Repressoren aus Gram-positiven Bakterien (*B. subtilis*, *Thermophilic bacterium*, *Staphylococcus xylosus*, *Lactobacillus pentosus*) sowie den N-Acetylglucosamin-Repressor (NagC-Repressor) aus *E. coli*. Die Gemeinsamkeiten dieser Proteine beziehen sich auf eine starke Sequenzidentität und auf eine N-terminale DNA-Bindedomäne sowie eine C-terminale Zucker-Bindedomäne (Scheler & Hillen, 1994; Titgemeyer *et al.*, 1994). Der Xylose-Repressor aus *B. megaterium* besitzt in seiner N-terminalen Domäne einen stark konservierten Bereich. Durch bioinformatische Vorhersagen wurde vermutet, dass der Xylose-Repressor als DNA-Bindemotiv eine Helix-Turn-Helix (HTH) besitzt. Die Helix-Turn-Helix gehört zu den am besten untersuchten DNA-Bindemotiven und bindet mit einer α -Helix in der großen Furche der DNA (Kauder *et al.*, 1993; Scheler & Hillen, 1994). Das Helix-Turn-Helix Motiv befindet sich zwischen der 32. und 51. Aminosäure (Scheler & Hillen, 1994). Die Struktur des Xylose-Repressor aus *B. megaterium* wurde bisher nicht beschrieben, da bisher keine erfolgreiche

Kristallisation des Proteins erfolgen konnte. Weitere Xylose-Repressoren aus anderen Organismen mit einer großen Aminosäuresequenz-Identität zu XylR aus *B. megaterium* (*B. subtilis* 70 %, *B. licheniformis* 50 %) wurden ebenfalls noch nicht erfolgreich kristallisiert.

Das am besten charakterisierte und bereits kristallisierte XylR stammt aus *E. coli* (Ni *et al.*, 2013). Der Xylose-Repressor aus *E. coli* besteht aus einer N-terminalen Domäne mit mehreren α -Helices und β -Faltblättern, während die C-terminale Domäne vollständig α -helical ist. Die beiden Domänen sind über einen langen Linker verbunden. Die N-terminale Xylose-Bindedomäne hat eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit den Transkriptionsregulatoren aus der LacI/GalR-Proteinfamilie. Die C-terminale DNA-Bindedomäne weist hingegen strukturelle Ähnlichkeiten mit den Regulatoren aus der AraC-Proteinfamilie auf. Die Kristallstruktur deutet darauf hin, dass der Xylose-Repressor aus *E. coli* über eine periplasmatische Bindepotein (PBP)-ähnliche Domäne im N-Terminus dimerisieren kann. Dies war bereits auch für Transkriptionsregulatoren aus der LacI/GalR-Proteinfamilie bekannt. Die PBP-ähnliche Domäne des XylR dimerisiert antiparallel. Diese Form der Dimeranordnung führt dazu, dass beide Xylose-Bindedomänen des Dimers jeweils ihr Substrat binden können ohne sich dabei zu behindern. Die Substratbindung erfolgt dabei zwischen zwei Subdomänen der PBP-ähnlichen Domäne und führt zu einer Konformationsänderung.

Song und Park stellen fest, dass die Zugabe von Xylose zu einer 70-fachen Erhöhung der Transkription der *xyl*-Gene in *E. coli* führte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Insertion im *xylR*-Gen die Transkription der *xyl*-Gene vollständig verhinderte. Durch Gelretardationsanalysen wurde festgestellt, dass die Zugabe von Xylose *in vitro* zu einer Bindung zwischen XylR und der Ziel-DNA führte. Daraus wurde geschlossen, dass der Xylose-Repressor aus *E. coli* als Aktivator fungiert und nicht wie in *B. megaterium* als Repressor (Song & Park, 1997). Die Identität der XylR-Aminosäuresequenz aus diesen beiden Organismen beträgt lediglich 19 % (ClustalW), so dass keine direkten Vergleiche gezogen werden können.

1.3 Das *lac*-Operon und dessen Transkriptionsregulatoren aus *Escherichia coli*

Im Kapitel 1.2 wurde der Xylose-Repressor und das Xylose-Operon beschrieben, dessen genaue Regulation durch den Xylose-Repressor XylR noch nicht eindeutig

bekannt ist. Daher wird in diesem Kapitel ein sehr genau charakterisiertes Operon vorgestellt, dessen Aufbau und Regulation ähnlich zur Vorstellung über die Regulation des Xylose-Operon ist. Das Laktose-Operon ist das bedeutendste und bekannteste Modell der Genregulation (Müller-Hill, 1996). Es kontrolliert eine Reihe von Genen in *E. coli* und wurde bereits seit 1940 intensiv untersucht (Benzer, 1953).

Das Laktose-Operon

Das Laktose-Operon besteht aus drei Strukturgenen (*lacZ*, *lacY* und *lacA*) sowie den regulatorischen Elementen (Promotoren und Operatoren) und dem *lacI*-Gen, das für den Laktose-Repressor codiert. Die Produkte der Strukturgene des Operons sind für den Transport (LacY) und die Verstoffwechselung (LacZ) des Zuckers Laktose verantwortlich. Der Laktose-Repressor LacI verändert durch die Bindung am Operator die Transkription der *lac*-Gene in Abwesenheit von Laktose. In Anwesenheit von Laktose hingegen wird LacI inaktiviert, so dass das *lac*-Operon transkribiert werden kann. Neben dem Repressor kontrolliert auch ein Aktivator-Protein das *lac*-Operon. Das „catabolite activator protein“ (CAP) aktiviert durch die Bindung an die DNA die Transkription der *lac*-Gene.

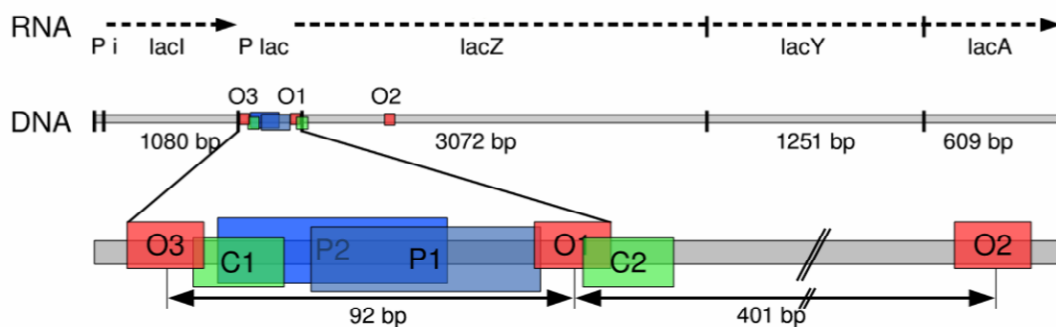


Abb. 3: Schematische Darstellung des Laktose-Operons in *E. coli*. Das Laktose-Operon besteht aus den Strukturgenen *lacZ*, das für die β -Galaktosidase codiert, *lacY*, das für die Laktose-Permease codiert und *lacA*, das für die Galaktosidase-Acetyltransferase codiert. Das *lacI*-Gen codiert für den Lac-Repressor LacI und liegt unter der Kontrolle seines eigenen Promotors P_i . Die regulatorischen Bereiche (unten im Bild dargestellt) bestehen aus mehreren Bindestellen für Proteine. Der *lac*-Promotor ($P1$ und $P2$ in blau) bindet die RNA-Polymerase, $C1$ und $C2$ (in grün) binden den Lac-Aktivator („catabolite activator protein“, CAP) und die Operatoren $O1$, $O2$ und $O3$ (in rot) binden den Lac-Repressor. $O1$ und $O3$ sind durch 92 bp getrennt, $O1$ und $O2$ durch 401 (verändert nach Patterson, 2009).

Das Enzym β -Galaktosidase (LacZ) katalysiert die Umwandlung von Laktose zu Allolaktose, die den natürlichen Induktor des Operons darstellt und den Repressor inaktivieren kann. Außerdem spaltet LacZ Laktose in Glukose und Galaktose. Alle drei Zucker können von der Zelle verstoffwechselt werden. Die Laktose-Permease

(LacY) ist ein Membran-Transporter, der die Laktose in die Zelle transportiert. Die Acetyltransferase (LacA) ist nicht direkt in den Zucker-Metabolismus involviert und wird daher an dieser Stelle nicht weiter diskutiert (Müller-Hill, 1996).

Der Lac-Repressor LacI

Das Repressorgen *lacI* liegt unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors P_i und wird unabhängig von den *lac*-Genen exprimiert. In Abwesenheit von Laktose bindet er an einen palindromischen 21 bp-langen Operator O_1 (rote Elemente, Abb. 3) und verhindert die Transkriptionsinitiation durch die RNA-Polymerase (Schmitz & Galas, 1979). In Anwesenheit von Laktose im Medium wird der Zucker durch die Laktose-Permease LacY in die Zelle transportiert und wird dort von der β -Galaktosidase zu Allolaktose konvertiert, die wiederum an den Lac-Repressor LacI bindet. Der Lac-Repressor verändert daraufhin seine Konformation und löst sich vom Operator, so dass die RNA-Polymerase am Promotor bindet, wobei sie immer nur an P_1 oder P_2 binden kann, da die Promotoren überlappen (blaue Elemente, Abb. 3). Folglich werden die *lac*-Gene exprimiert, so dass die β -Galaktosidase, Laktose-Permease und Acetyltransferase synthetisiert werden (Narang, 2007). Die Bindung der RNA-Polymerase an P_1 erfolgt dabei in Anwesenheit des Aktivators, an P_2 in Abwesenheit (Donnelly & Reznikoff, 1987).

LacI ist ein aus 360 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 38,7 kDa. Die primäre Bindestelle des Lac-Repressor ist der Operator O_1 . Die Operatoren O_2 und O_3 werden mit einer geringen Affinität vom Repressor gebunden. Bindet LacI an den Operator O_1 , wird das *lac*-Operon reprimiert, während eine alleinige Bindung an O_2 oder O_3 nicht zur Reprimierung führt (Narang, 2007). Der aktive Lac-Repressor ist ein Tetramer und kann als „Dimer von einem Dimer“ betrachtet werden. Jedes Dimer besitzt am N-Terminus eine DNA-Bindedomäne. Über den C-Terminus werden die beiden Dimere zu einem Tetramer oligomerisiert. Über die zwei DNA-Bindedomänen kann der Repressor gleichzeitig an zwei Operatoren (beispielsweise O_2 und O_3) binden, wodurch DNA-Loops generiert werden, die die Reprimierung erhöhen. Die erhöhte Reprimierung kommt dadurch zustande, dass der Loop die räumliche Nähe von Repressor und DNA erhöht. Kommt es zu einer Ablösung des Repressors von der DNA, so befindet sich diese durch den Loop noch in unmittelbarer Nähe zum Repressor, sodass es schnell zu

einer erneuten Bindung kommen kann. Dies führt zu einer verbesserten Reprimierung.

Jedes Monomer des Proteins kann ein Molekül des Induktors Allolaktose binden, was zu einer Konformationsänderung führt, so dass sich die Affinität zur DNA verringert oder ganz verloren geht (Saiz & Vilar, 2008). Solange eine der beiden Substratdomänen keinen Induktor gebunden hat, ist der Repressor noch befähigt an einen Operator auf der DNA zu binden (Narang, 2007).

Anders als der Xylose-Repressor aus *B. megaterium* (Kapitel 1.2.3) gehört der Lac-Repressor in die Familie der LacI/GalR-Transkriptionsfaktoren. Zu dieser Familie zählen über 1000 Mitglieder, deren Zuordnung durch Protein-BLAST erfolgte (Swint-Kruse & Matthews, 2009). Die Mitglieder dieser Proteinfamilie regulieren Gene, deren Genprodukte für den Katabolismus, die Toxizität oder Nukleotid-Synthese verantwortlich sind. Allen ist jedoch gemeinsam, dass sie ein Helix-Turn-Helix (HTH)-Motiv besitzen, mit dem sie mit einer bestimmten Affinität an die DNA binden. Die Affinität dieser Bindung kann durch die Bindung zwischen dem Transkriptionsfaktor und einem Effektormolekül (z.B. Laktose) verändert werden (Swint-Kruse & Matthews, 2009).

Mit der erfolgreichen Kristallisation des Operator-Protein-Komplexes konnte aufgeklärt werden welche Bereiche der Aminosäuresequenz für die Oligomerisierung und die DNA- sowie Effektorbindung verantwortlich waren (Lewis *et al.*, 1996). Der N-terminale Bereich des Lac-Repressors ist für die DNA-Bindung verantwortlich und enthält das HTH-Motiv (Geisler & Weber, 1977), was auch auf die Vermutung über den Xylose-Repressor zutrifft (Kapitel 1.2.3), während in der Core-Domäne die Effektorbindung und über die C-terminale Domäne die Dimerisierung der Lac-Dimere stattfindet (Lewis *et al.*, 1996).

Der Lac-Aktivator CAP

Wie bereits beschrieben, ist *E. coli* in der Lage den Zucker Laktose durch das Laktose-Operon zu verstoffwechseln. Allerdings bevorzugt *E. coli* als Kohlenstoffquelle Glukose, wenn beide Zucker zur Verfügung stehen. Erst wenn die Glukose aufgebraucht ist, wird die Laktose verstoffwechselt. In Wachstumsexperimenten, bei denen Glukose und Laktose als Kohlenstoffquelle verwendet wird, wird die bevorzugte Verstoffwechselung von Glukose als diauxisches Wachstum erkennbar, was als kleines Plateau in der Wachstumskurve

sichtbar wird (Monod, 1941). Während dieses Plateaus werden die Gene für die Verstoffwechselungen der Laktose exprimiert, so dass es zu einer kurzen Verzögerung des Wachstums kommt. Stehen dann die Enzyme für die Verstoffwechselung der Laktose in der Zelle zur Verfügung, wird das Wachstum weiter fortgesetzt.

In Anwesenheit von Glukose befindet sich der Aktivator CAP in seiner inaktiven Form, so dass die Transkription des *lac*-Operons nicht mehr gefördert wird. Dieser Mechanismus wird über die vorhandene Glukose-Konzentration gesteuert. Die Anwesenheit von Glukose hemmt das Enzym Adenylat-Cyclase. Durch diese Hemmung findet keine Umsetzung von ATP zu cAMP („cyclic adenosine monophosphate“) statt, ein Botenstoff, der an CAP bindet und diesen dadurch erst in seine aktive Form bringt. CAP wirkt also nur als Aktivator des *lac*-Operons, wenn er als CAP/cAMP-Komplex vorliegt. Außerdem hemmen bestimmte Transportproteine in Anwesenheit von Glukose die Laktose-Permease, so dass der Zucker gar nicht erst in die Zelle aufgenommen wird und das *lac*-Operon nicht transkribiert werden kann (Induktorausschluss). Die Bevorzugung der Glukose-Verwertung und die Verzögerung der Laktose-Verwertung werden auch allgemein als Katabolitrepression bezeichnet (Görke & Stülke, 2008).

Bindet der CAP/cAMP-Komplex in Abwesenheit von Glucose an *C1* (grüne Elemente, Abb. 3) aktiviert er das *lac*-Operon indem er die Äffinität von RNA-Polymerase und Promotor *P1* verstärkt und die Stabilität des offenen Komplexes von DNA und RNA-Polymerase vergrößert. Die CAP/cAMP-abhängige Bindung der RNA-Polymerase findet bevorzugt am *P1* statt, da die Bindung an *P2* durch den an *C1*-gebundenen CAP/cAMP-Komplex behindert ist. Bindet der CAP/cAMP-Komplex hingegen an *C2*, konkurriert er sterisch mit dem Repressor, der daraufhin schlechter an den Operator *O1* binden kann, wobei letzteres eine untergeordnete Rolle spielt (Santillán & Mackey, 2004). Die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor *P2* ist nur in Abwesenheit des CAP/cAMP-Komplexes möglich, so dass diese Bindung auch in Anwesenheit von Zuckern erfolgen kann, die die cAMP-Synthese hemmen (Donnelly & Reznikoff, 1987).

1.4 Entwicklung und Etablierung eines Xylose-induzierbaren Expressionssystems für die rekombinante Proteinproduktion in *Bacillus megaterium*

Seit vielen Jahrzehnten kommt der Gram-negative *E. coli* für die rekombinante Proteinproduktion bevorzugt zum Einsatz (Makrides, 1996). Er gehört zu den am besten untersuchten Expressionswirten und wurde bereits für zahlreiche Produktionen von rekombinanten Proteinen eingesetzt, wodurch eine Vielzahl von etablierten Methoden und sogar handelsübliche Vektorsysteme wie das pET-System (Novagen) zur Verfügung stehen (Makrides, 1996). Auch physiologische Eigenschaften, wie die kurze Generationszeit und die große Robustheit gegenüber wechselnden oder nicht-optimalen Bedingungen verschaffen *E. coli* einen Vorteil für den Einsatz in der rekombinanten Proteinproduktion. Außerdem lässt sich *E. coli* schnell und effizient transformieren, was einen Vorteil für die plasmid-basierte rekombinante Proteinproduktion darstellt. Durch seinen Gram-negativen Charakter ist die Anwendung von *E. coli* für die rekombinante Proteinproduktion aber teilweise auch limitiert. Die mit der Außenmembran assoziierten Endotoxine erschweren den Einsatz von *E. coli* in der Pharma- und Lebensmittelindustrie und das Fehlen eines effizienten Sekretionsapparates verhindert die direkte Proteinsekretion in das Medium.

Um diese einschränkenden Merkmale zu umgehen, können Gram-positive Expressionswirte, wie zum Beispiel *Bacillus* sp., in der rekombinanten Proteinproduktion eingesetzt werden. Ihnen fehlen die mit der Außenmembran assoziierte Endotoxine und die Außenmembran selbst, was die Einsatzmöglichkeiten des produzierten Proteins und die Sekretion von Proteinen erleichtern kann. Im Vergleich zu anderen *Bacillus* sp., wie zum Beispiel *B. subtilis*, besitzt *B. megaterium* eine sehr hohe Plasmidstabilität, was ihn gegenüber anderen Gram-positiven Bakterien auszeichnet. Durch seine hohe Plasmidstabilität ist eine stabile Proteinproduktion über lange Zeiträume möglich. Über den sec (secretion)-Pathway können Proteine direkt in das Medium sekretiert werden, wodurch aufwendige Zellschluss- und Aufbereitungsarbeiten entfallen. Außerdem ist bereits bekannt, dass *B. megaterium* in der Lage ist, sehr große Proteine mit einer Molekülmasse von bis zu ~170 kDa zu sekretieren (Malten *et al.*, 2004). Zusätzlich besitzt *B. megaterium* die Fähigkeit, zahlreiche C-Quellen zu verstoffwechseln, was eine preiswerte Kultivierung ermöglichen kann. Es konnte gezeigt werden, dass *B. megaterium* in der Lage ist, Rohglycerin, ein Abfallprodukt der Biodieselindustrie, als einzige C-Quelle

zu verstoffwechseln (Korneli *et al.*, 2012). Mit der Verfügbarkeit eines passenden induzierbaren Expressionssystems für *B. megaterium* wurde der Einsatz von *B. megaterium* als alternativer Expressionswirt möglich.

Bereits 1991 brachten Rygus und Hillen das *xylR*-Gen mit dessen Promotor P_{xylR} , den Promotor P_{xylA} und 195 bp des 5'-Bereichs von *xylA* in einen *Bacillus-E. coli*-Shuttlevektor, der auf den Replicons pBC16 und pBR322 basierte und damit die Replizierung in zwei unterschiedlichen Bakterien möglich machte (Rygus *et al.*, 1991). Für die Selektion in *B. megaterium* enthielt das Plasmid außerdem das *tetL*-Gen, das für die Tetrazyklin-Effluxpumpe aus *B. cereus* codiert, sowie das β -Lactamasegen für die Selektion in *E. coli*. Für das Klonieren von unterschiedlichen Genen wurde außerdem downstream des *xylA*-Gens eine MCS („multiple cloning site“) eingebracht. Der so entstandene Vektor pWH1520 bildete die Grundlage für die Xylose-induzierbare rekombinante Proteinproduktion in *B. megaterium* (Rygus & Hillen, 1991). Einige intrazelluläre Proteine wie die β -Galaktosidase aus *E. coli*, Glukose-Dehydrogenase aus *B. megaterium* (Rygus & Hillen, 1991) und Toxin A aus *Clostridium difficile* (Burger *et al.*, 2003) konnten bereits erfolgreich mit diesem Expressionssystem in *B. megaterium* produziert werden.

Nachfolgend wurde das genutzte Expressionssystem weiterentwickelt und optimiert. Das resultierende Plasmid pMM1520 enthält eine erweiterte MCS mit 15 einzigartigen Restriktionsschnittstellen, die das Klonieren von rekombinanten Genen erleichtert. Außerdem wurde das „catabolite response element“ (*cre*-Element) am 5'-Ende des *xylA*-Gens entfernt. Das *cre*-Element dient als Bindestelle für das „catabolite control protein“ (CcpA), das in Anwesenheit von Glukose am *cre*-Element bindet und so die Verwertung anderer Kohlenstoffquellen verhindert, wenn Glukose als leicht verwertbare Kohlenstoffquelle vorliegt. Durch das Entfernen dieses Elements ist die Genexpression trotz vorhandener Glukose im Medium nicht mehr beeinträchtigt (Malten *et al.*, 2005). Basierend auf diesem Expressionssystem wurde in vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zahlreiche extra- und intrazelluläre Proteine wie die extrazelluläre homologe Penicillinamidase (Yang *et al.*, 2006), die extrazelluläre heterologe Hydrolase (TFH) aus *Thermobifida fusca* (Yang *et al.*, 2007), die extrazelluläre heterologe Dextransucrase aus *Leuconostoc mesenteroides* (Malten *et al.*, 2005), das intrazelluläre heterologe grün fluoreszierende Protein (Gfp) aus *Aequorea victoria* (Biedendieck *et al.*, 2007 b) und die intrazellulären heterologen Formiat- und Mannitoldehydrogenase aus *Mycobakterium vaccae* bzw. *Leuconostoc*

pseudomesenteroides (Roth, 2005) erfolgreich rekombinant produziert. Des Weiteren wurde dieses bestehende Vektorsystem um die Sequenzen für His₆- bzw. StrepII-Tag und Proteaseschnittstellen erweitert, was die affinitätschromatographische Reinigung von Proteinen mit N- oder C-terminal fusionierten Tag und die Abspaltung der N-terminalen Tags ermöglicht (Biedendieck *et al.*, 2007 b).

Um die Expressionsrate des Ziel-Gens unter der Kontrolle des Xylose-induzierbaren Promotors zu erhöhen und somit auch die Menge an rekombinantem Protein zu steigern, wurde der Vektor pMM1520 weiter optimiert. Dafür wurde die -10 und die -35 Region des nativen P_{xyIA}, die 5' untranslatierte Region (UTR) und die Ribosombindestelle (RBS) untersucht und entsprechend verändert. Eine Änderung der Promotorsequenz kann die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor verbessern, was zu einer verbesserten Transkriptionseffizienz führt und somit möglicherweise auch zu einer höheren Menge an rekombinantem Protein. Je ähnlicher die -10 und die -35-Region des Promotors zu der Consensussequenz TATAAT (für -10-Region) und TTGACA (für -35-Region) sind, desto stärker ist der Promotor (Kanaya & Kudo, 1991). Durch eine Änderung der 5'-UTR-Sequenz in der XylR-Bindestelle des Expressionsplasmids kann die mRNA-Halbwertszeit durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen erhöht werden. Eine Erhöhung der Stabilität der Ziel-mRNA kann ebenfalls die Effizienz der Translation steigern, da die mRNA ständiger Degradation durch RNasen ausgesetzt ist (Deutscher, 2006). Eine optimierte Ribosombindestelle für *B. megaterium* existierte bereits und wurde schon erfolgreich für die rekombinante Proteinproduktion eingesetzt (Malten *et al.*, 2005). Diese angepasste Ribosombindestelle ist hoch komplementär zum 3'- Ende der 16S rRNA der *B. megaterium* Ribosomen, was zu einem Anstieg der Affinität zwischen mRNA und Ribosomen sowie zu einem verbesserten Translationsstart führen soll. Die beste Kombination der genetischen Elemente von optimierter -35-Region und RBS führte zu einem 11-fachen Anstieg der rekombinanten Produktion von Gfp als Modellprotein (Stammen *et al.*, 2010). Der resultierende Vektor p3STOP1623hp bildet auch die Grundlage des in dieser Arbeit verwendete Expressionssystems, das in der Abb. 4 dargestellt wird.

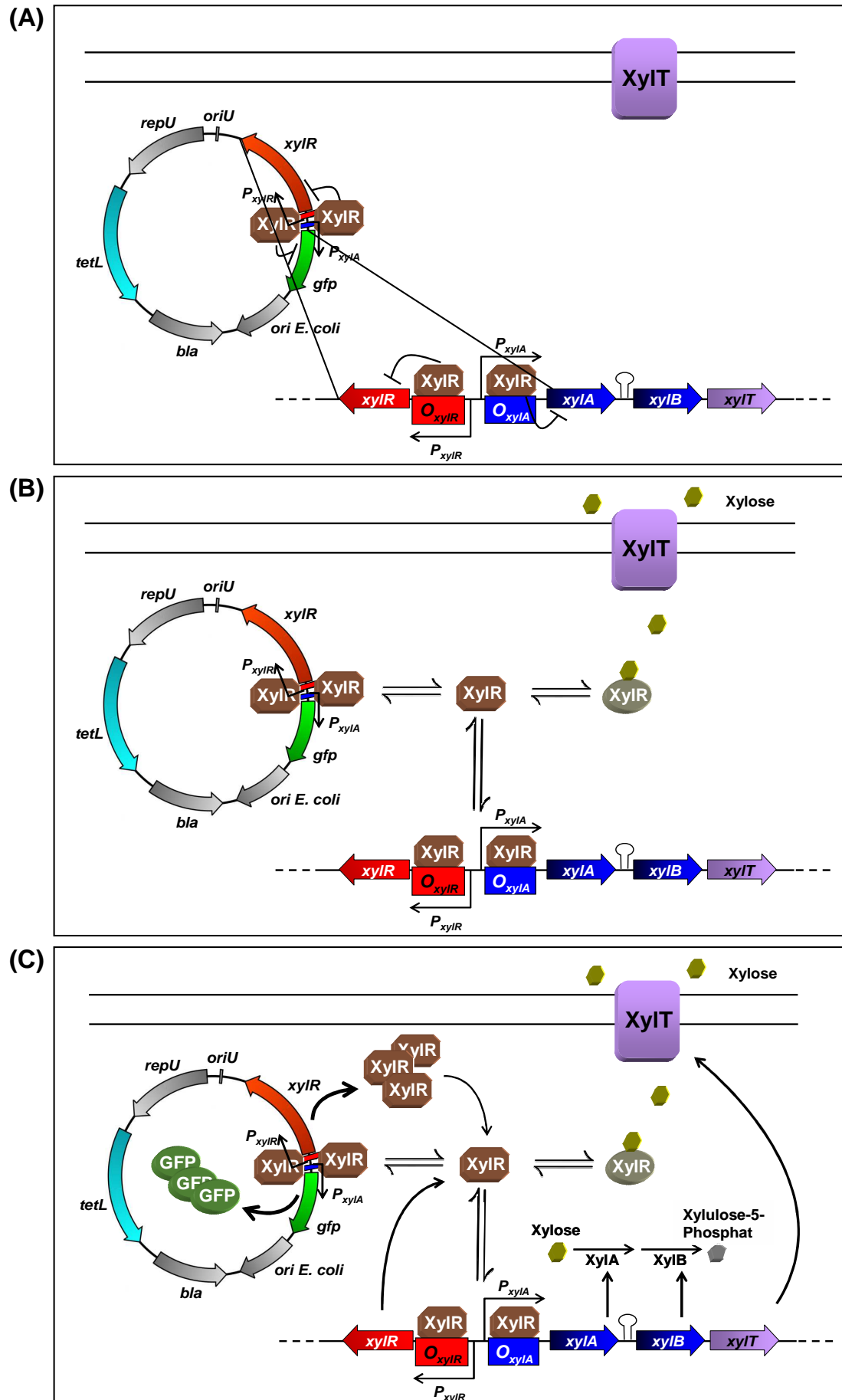


Abb. 4: Modell des Xylose-induzierbaren Expressionssystems für die rekombinante Proteinproduktion (Gfp) in *B. megaterium*. (A) Dargestellt ist die Membran der Bakterienzelle mit der Xylose-Permease XylT, das optimierte Expressionsplasmid und der Teil der genomischen DNA von *B. megaterium*, der das Xylose-Operon enthält (eingezeichneter Ausschnitt). Das Expressionsplasmid verfügt über einen Replikationsursprung für *B. megaterium* (*oriU* / *repU* aus *B. cereus*) und für *E. coli* (*ori*) sowie über Resistenzgene (*tetL* für *B. megaterium* und *bla* für *E. coli*). In Abwesenheit des Induktors Xylose bindet der Xylose-Repressor an die Operatorsequenzen O_{xylR} und O_{xylA} und verhindert somit die Transkription der Gene. (B) In Anwesenheit von Xylose bindet diese an den Repressor, was zu einer Konformationsänderung führt. Dem Modell zufolge löst sich der Repressor daraufhin von der DNA oder ist nicht mehr in der Lage dort zu binden, (C) was zur Transkription der *xylR*-Gene, des *xyl*-Operons und des Modellproteins *gfp* führt.

Der Xylose-induzierbare Promotor wurde auch bereits erfolgreich für Vektorsysteme genutzt, die virale RNA-Polymerasen für die heterologe Genexpression nutzen. Bei dieser Art von Vektorsystemen werden zwei Vektoren in den Expressionswirt eingebracht. Dabei enthält ein Vektor das virale RNA-Polymerasegen unter der Kontrolle des Xylose-induzierbaren Promotors und der andere Vektor den zugehörigen viralen Promotor gefolgt von dem Zielgen. Für *B. megaterium* wurde ein Expressionssystem entwickelt und etabliert, was auf der viralen T7 RNA-Polymerase des T7-Bakteriophagen beruht (Gamer *et al.*, 2009). Die T7 RNA-Polymerase ist sehr promotorspezifisch und stellt in Kombination mit dem T7-Promotor ein besonders starkes Expressionssystem dar, wodurch große Mengen an rekombinantem Protein produziert werden können. Ein weiterer Vorteil ist, dass dieses Promotorsystem eine strikte Promotorkontrolle in *E. coli* zeigt, so dass das Klonieren, vor allem von toxischen Genen, erleichtert wird (Biedendieck *et al.*, 2011). Im Rahmen der Entwicklung und Etablierung des Xylose-induzierbaren Expressionssystems im *B. megaterium* wurden Gfp-produzierende Zellen mittels fluorescence-activated cell sorting (FACS)-Analyse untersucht (Biedendieck *et al.* 2007 b). Dabei fiel auf, dass nicht alle Zellen (~ 30 %) fähig waren Gfp zu produzieren und somit eine sogenannte phänotypische Heterogenität zeigten (Münch *et al.*, 2015).

1.5 Phänotypische Heterogenität

In der Wissenschaft werden Populationen von Bakterien als genetisch identisch betrachtet, denn das Wachstum von Bakterien wird als symmetrische Zellteilung angesehen, die zwei isogene Zellen hervorbringt (Kearns & Losick, 2005). Bakterien einer Population konnten lange Zeit nur auf ihr durchschnittliches Verhalten untersucht werden und wurden als homogene Probe mit identischen Eigenschaften

angesehen, da entsprechende Messmethoden noch nicht zur Verfügung standen (Davidson & Surette, 2008). Doch in den letzten Jahren entwickelten und etablierten sich neue Techniken, um Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu untersuchen. Heutzutage sind die Durchflusszytometrie, die Fluoreszenzmikroskopie und die Time lapse-Mikroskopie wichtige Bestandteile für die Analyse auf Einzelzelleben und ermöglichen das Untersuchen des Zustandes von einzelnen Zellen aus einer Gesamtpopulation (Cheong *et al.*, 2010). Mit Hilfe dieser neuen Techniken wurde entdeckt, dass Populationen unter bestimmten Bedingungen phänotypisch heterogen sind (Kearns & Losick, 2005). Diese phänotypische Heterogenität beschreibt das Phänomen, dass genetisch identische Zellen unter gleichen Bedingungen unterschiedliche Phänotypen hervorbringen und sogar zwei ko-existierende stabile Zustände entstehen können (Dubnau & Losick, 2006; Ackermann *et al.*, 2008). Die Heterogenität wird daher auch oft als Bistabilität bezeichnet (Dubnau & Losick, 2006). Dabei zeigt sich das unterschiedliche Verhalten der Subpopulationen beispielsweise durch Unterschiede in der Morphologie, Zusammensetzung der Zellkomponenten oder im Wachstum (Levy, 2016). Die Untersuchung dieser bakteriellen Individualität, die weder durch Gene noch durch die Umwelt generiert wurde, kann zu neuen Informationen darüber führen, wie bakterielle Gemeinschaften funktionieren.

Die erste Dokumentation von heterogenen Phänotypen innerhalb einer Population reicht bis in das Jahr 1944 zurück und wurde erstmal bei dem Bakterium *Staphylococcus aureus* beschrieben (Bigger, 1944).

1.5.1 Ursachen für phänotypische Heterogenität

1.5.1.1 Stochastisches Rauschen, positive Feedbackschleifen und autokatalytische Genexpression eines Transporters

Stochastisches Rauschen

Bakterien einer isogenen Population können verschiedene Phänotypen aufweisen. Diese phänotypischen Unterschiede können unter anderem durch Variationen in der Expression eines bestimmten Gens auftreten, was auch als stochastisches „Rauschen“ bezeichnet wird (Swain *et al.*, 2002).

Dass das zufällige Rauschen in der Genexpression die Ursache für die Variationen im Phänotyp sein kann, wurde erstmals von Elowitz *et al.* experimentell gezeigt

(Elowitz *et al.*, 2002). Elowitz unterschied dabei zwischen dem extrinsischen und intrinsischen Rauschen.

Das extrinsische Rauschen bezeichnet die Variation der Menge an spezifischen Molekülen, die für die Genexpression notwendig sind, wie zum Beispiel die Menge der Polymerasen, in den verschiedenen Zellen einer Population. Unterschiedliche Mengen dieser Moleküle in den einzelnen Zellen entstehen zum Beispiel durch unterschiedliche Bakterien-Generationen innerhalb einer Population. Außerdem kann eine Variation der für die Genexpression wichtigen Moleküle auch durch eine ungleiche Verteilung dieser Bestandteile während der Zellteilung hervorgerufen werden. Unter dem intrinsischen Rauschen versteht man Variationen in der Transkription eines Gens, die als zufälliges Zusammentreffen von Polymerase und Promotor angesehen werden können. Die Zelle wird dabei als dynamisches System gesehen, in der wichtige Reaktanten der Transkription zufällig aufeinandertreffen. Extrinsisches und intrinsisches Rauschen können dazu führen, dass sich genetisch identische Zellen einer Population bezüglich ihrer Proteinzusammensetzung unterscheiden, so dass Variationen im Phänotyp auftreten können (Elowitz *et al.*, 2002).

Elowitz *et al.* zeigten experimentell, dass das intrinsische und extrinsische Rauschen für die unterschiedliche Expression zweier Fluoreszenzproteine, „yellow fluorescent protein“ (Yfp) und „cyan fluorescent protein“ (Cfp), die jeweils unter der Kontrolle des gleichen Promotors lagen, verantwortlich waren. Das extrinsische Rauschen (Variation in der Menge von zum Beispiel Polymerasen zwischen den Zellen) betraf die korrelierte Expression beider Gene (*cfp* und *yfp*) innerhalb einer Zelle, wobei stets äquivalente Mengen beider Fluoreszenzproteine produziert wurden, die aber zwischen den Zellen variieren konnten. Beispielsweise produzierte eine Zelle von beiden Fluoreszenzproteinen gleich wenig, während eine andere Zelle von beiden Proteinen gleich viel produzierte.

Gleiche Mengen beider Fluoreszenzproteine zeigten einen einfarbigen Phänotyp. Das intrinsische Rauschen (Variationen in der Transkription durch das zufällige aufeinandertreffen von Polymerasen und Promotor) führte zu einer unterschiedlichen Expression beider Gene innerhalb der Zelle und somit zu verschiedenen farbigen Phänotypen. Abb. 5 zeigt die unterschiedlichen Phänotypen, die durch intrinsisches und extrinsisches Rauschen entstanden sind.

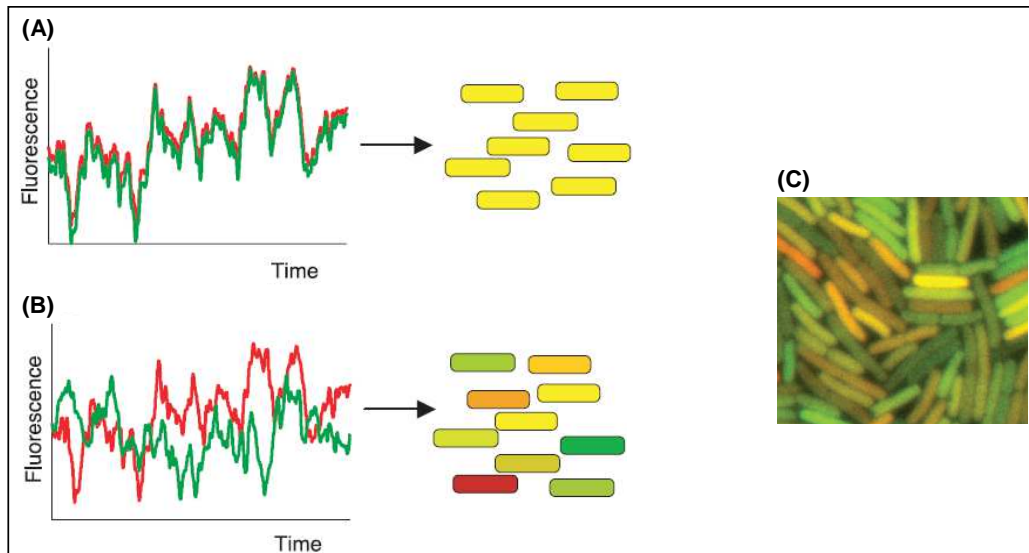


Abb. 5: Phänotypische Variation einer isogenen *E. coli*-Population während der heterologen Produktion von Cfp und Yfp durch (A) extrinsisches und (B) intrinsisches Rauschen. Das intrinsische und extrinsische Rauschen wurde durch die Quantifizierung zweier Fluoreszenzproteine (Cfp in grün und Yfp in rot) gezeigt. Dabei liegen die Gene unter der Kontrolle des gleichen Promotors. **(A)** Zellen, die gleiche Mengen beider Fluoreszenzproteine beinhalteten, erschienen gelb. Die Menge an Cfp und Yfp korrelierte über die Zeit in einer Zelle. Durch das extrinsische Rauschen können die äquivalenten Mengen an Cfp und Yfp aber zwischen den einzelnen Zellen variieren. **(B)** Zellen, die unterschiedliche Menge der Fluoreszenzproteine beinhalteten, erscheinen rot (Yfp) oder grün (Cfp). Durch das intrinsische Rauschen werden die *cfp*- und *yfp*-Gene innerhalb einer Zelle unterschiedlich stark exprimiert. **(C)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen Variationen im Phänotyp (gelbe, rote und grün fluoreszierende Zellen) durch ex- und intrinsisches Rauschen (verändert nach Elowitz *et al.*, 2002).

Positive Feedbackschleifen

Das zufällige Rauschen führt nicht nur zu phänotypischen Variationen, sondern letztendlich auch zur phänotypischen Heterogenität mit verschiedenen Zuständen, die auch als „ON“ und „OFF“ bezeichnet werden (Dubnau & Losick, 2006; Davidson & Surette, 2008; Mitarai *et al.*, 2015). Genauer ausgedrückt kann die phänotypische Heterogenität durch Rauschen in der Expression eines Masterregulatorgens entstehen, dessen Genprodukt zum Beispiel für die Transkription bestimmter Gene notwendig ist. Beispielsweise wird die Entwicklung von Sporen oder genetischer Kompetenz durch Masterregulatoren kontrolliert. Hierbei beschreibt der Begriff phänotypische Heterogenität dann das Auftreten von Sporen („ON“) und vegetativen Zellen („OFF“) bzw. kompetenten („ON“) und nicht-kompetenten Zellen („OFF“) innerhalb einer Population. Die Masterregulatoren liegen in genetisch identischen Zellen einer Population durch das Rauschen in der Genexpression in unterschiedlichen Mengen vor. Um die Masterregulatorgene zu regulieren oder zu aktivieren, ist es aber notwendig, dass die Menge des Masterregulators einen bestimmten Schwellenwert erreicht. Kommt es in einem Teil der Population durch

zufälliges Rauschen zum Erreichen des Schwellenwertes, aktiviert der Masterregulator durch positive Autoregulation die Transkription seiner eigenen Gene, was auch als positive Feedbackschleife bezeichnet wird. Positive Feedbackschleifen in Verbindung mit einer nichtlinearen Antwort des Masterregulators begünstigen somit das Vorhandensein von unterschiedlichen Mengen der aktiven Masterregulatoren in den einzelnen Zellen. Die nichtlineare Antwort des Masterregulators erfolgt, wenn der Masterregulator ein Multimer bilden muss, um aktiv zu werden. Dementsprechend muss eine gewisse Menge des Masterregulators vorhanden sein und oligomerisieren, damit das aktive Multimer überhaupt vorhanden ist.

Bei einer positiven Feedbackschleife wirkt der Masterregulator verstärkend auf sich selbst, so dass Zellen eine noch größere Menge des Masterregulators akkumulieren. Dadurch kann ein Teil der Zellen der isogenen Population den Masterregulator oberhalb des bestimmten Schwellenwerts enthalten, so dass sowohl die autoregulierten Gene des Masterregulators als auch die Gene, die durch diesen Regulator kontrolliert werden (zum Beispiel Gene für Sporenbildung oder Kompetenzentwicklung), transkribiert werden können. Diese Zellen zeigen dann den „ON“ Phänotyp. Der restliche Teil der isogenen Population enthält den Masterregulator durch zufälliges Rauschen oder Degradation durch Proteasen unterhalb des bestimmten Schwellenwerts, so dass die eigenen Gene und die Gene, die durch diesen Regulator kontrolliert werden, nicht aktiviert werden können. Diese Zellen zeigen dann den „OFF“ Phänotyp. Durch das Vorhandensein eines Schwellenwertes und der verstärkenden Feedbackschleife kann es in einer Population zu zwei deutlich unterschiedlichen Zuständen kommen, die sich in zwei unterschiedlichen Phänotypen widerspiegeln. Das Verhalten eines Systems, das gleichzeitig unterschiedliche Zustände bei gleichen Bedingungen annehmen kann, wird auch als Hysterese bezeichnet (Mitrophanov & Groisman, 2008). Durch das zufällige Rauschen und die damit bedingte Änderung in der Regulator-Konzentration kann der Phänotyp einer Subpopulation auch in den ko-existierenden Phänotyp umschlagen (Dubnau & Losick, 2006).

Positive Feedbackschleifen in Verbindung mit einer nichtlinearen Antwort des Masterregulators können eine Voraussetzung für phänotypische Heterogenität sein und liefern die bekannteste Ursache für die Entstehung von heterogenen Phänotypen (Dubnau & Losick 2006; Ferrell, 2002).

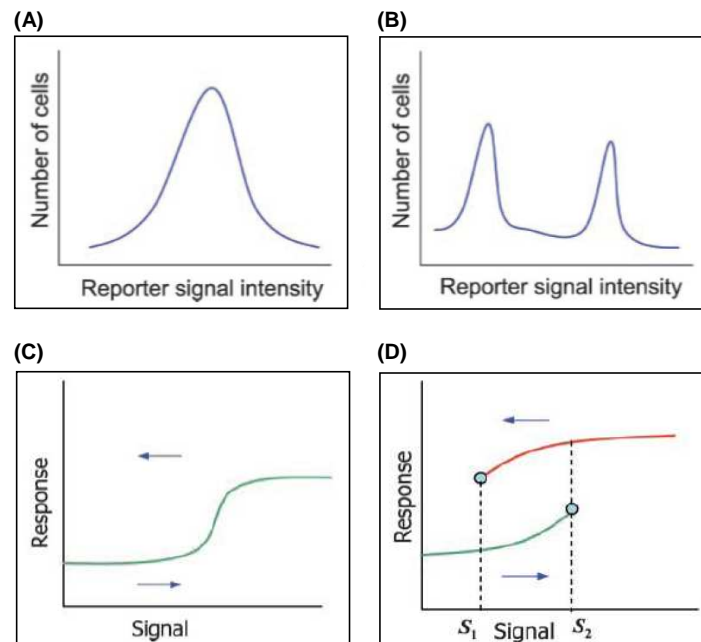


Abb. 6: Schematische Verteilung eines (A) monostabilen und (B) bistabilen Verhaltens und die entsprechende Signal-Antwort Kurve für ein (C) monostabiles und (D) bistabiles Verhalten. Die Intensität des Reporter-Signals für die (A) monostabile und (B) bistabile Verteilung im Histogramm wurde für eine bestimmte Anzahl an Zelle einer Population gemessen. Entlang der x-Achse nimmt die Intensität des Reportersignals innerhalb der Zelle zu. (C) Unabhängig von der Änderung der Signalintensität kann das System nur einen (monostabilen) Zustand annehmen. Die Steigung in der Signal-Antwort-Kurve spiegelt die sensitive Region wider, in der der Schwellenwert eines Regulators überschritten wird, wodurch entsprechende Gene aktiviert werden. (D) Bei einer Intensität des Reportersignals unterhalb von S_1 bzw. überhalb von S_2 existiert nur ein Zustand in der Population. Zwei Zustände ko-existieren, wenn die Intensität des Reportersignals zwischen S_1 und S_2 liegt (Hysterese). Ändert sich die Intensität des Signals (durch blaue Pfeile angeordnet) verändert sich das System entsprechend der grünen oder roten Signal-Antwort Kurve (verändert nach Mitrophanov & Groisman, 2008).

Abb. 6 zeigt, dass die Reportersignale eines theoretischen monostabilen Zustandes durch stochastisches Rauschen variieren, so dass es zu kleineren Variationen des Phänotyps kommen kann, die sich in der Peakbreite widerspiegeln (Abb. 6 A). Das stochastische Rauschen kann durch positive Feedbackschleifen mit einer nichtlinearen Antwort des Regulators verstärkt werden, so dass der Masterregulator in den Zellen akkumuliert und den Schwellenwert erreicht („ON-Phänotyp“) oder unterhalb bleibt („OFF-Phänotyp“). Außerdem kann es durch den Abbau des Regulators durch Proteasen, die ebenfalls einer Schwankung durch Rauschen in der Genexpression unterliegen, zu unterschiedlichen Masterregulator-Konzentrationen in den Zellen kommen. Zudem unterliegt die Oligomerisierung des Repressors dem intrinsischen Rauschen, was dazu führen kann, dass der Masterregulator in einigen Zellen aktiv (nach Oligomerisierung) oder noch inaktiv als Monomer vorliegen kann (Abb. 6 B). In Folge dessen kann es zur Bistabilität mit zwei Zuständen kommen.

Autokatalytische Genexpression eines Transporters

Neben der positiven Feedbackschleife eines Masterregulators kann die phänotypische Heterogenität auch durch eine sogenannte „autokatalytische Genexpression eines Transporters“ hervorgerufen werden (Khlebnikov *et al.*, 2000). Die autokatalytische Genexpression eines Transporters tritt immer dann auf, wenn das Gen, das für den Transporter eines Induktors codiert, durch diesen Induktor selbst kontrolliert wird. Dabei kann es sich beispielsweise um einen Zucker-Transporter (Permease) handeln, der einen bestimmten Zucker (Induktor) in die Zelle transportiert und dadurch den Promotor des Transportergens induziert.

Vor der Induktion ist bereits eine sehr geringe Menge der Permeasen in der Membran vorhanden, die zu Beginn den Zucker in die Zelle transportieren. Akkumuliert der Induktor innerhalb der Zelle und erreicht einen bestimmten Schwellenwert, so wird die Expression der Permease und anderer assoziierter Gene induziert. Die Produktion des Transporters und der dadurch verstärkte Transport des Induktors führen zur maximalen Genexpression des Transporters und anderer assoziierter Gene. Diese Zellen zeigen folglich den „induzierten Phänotyp“.

Durch intrinsisches (Variationen in der Transkription durch das zufällige Aufeinandertreffen von Polymerase und Promotor sowie Induktor und Repressor) und extrinsisches (Variation in der Menge von zum Beispiel Polymerasen, Repressoren und Induktor zwischen den Zellen) Rauschen kann es zu Variationen in der Genexpression des Permeasegens kommen, so dass einige Zellen vor Induktion mehr oder weniger Transporter in ihre Membran besitzen. Zellen, die vor der Induktion eine so geringe Menge an Transporter in der Membran besitzen, dass sich der Induktor nicht ausreichend innerhalb der Zelle ansammeln kann, um den Promotor zu induzieren, zeigen den „nicht-induzierten Phänotyp“. Der Transporter in der Membran unterliegt zusätzlich noch einem Verdünnungseffekt durch Zellteilung, so dass auch die entstehenden Tochterzellen zu geringe Mengen an Transporter auf ihrer Oberfläche besitzen. Diese Tochterzellen zeigen mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls den „nicht-induzierten Phänotyp“ (Siegele & Hu, 1997; Khlebnikov *et al.* 2000). Das Vorhandensein der „induzierten“ und „nicht-induzierten Phänotypen“ aufgrund der autokatalytischen Genexpression eines Transporters wird auch als „alles-oder-nichts Phänomen“ bezeichnet (Novick & Weiner 1957). Neben dem Transportergen können auch weitere Gene der Kontrolle durch den Induktor unterliegen, wie beispielsweise eingebrachte fluoreszierende Reportergene in

Expressionssystemen, die dann ebenfalls dem „alles-oder-nichts Phänomen“ unterliegen. In solchen Systemen werden die „induzierten“ und „nicht-induzierten Phänotypen“ dann als fluoreszierende und nicht-fluoreszierende Subpopulationen sichtbar, was als phänotypische Heterogenität bezeichnet wird.

Auch in *B. megaterium* wird *xytT*, das für die Xylose-Permease codiert, durch den zu transportierenden Induktor Xylose kontrolliert (Kapitel 1.4).

Dass phänotypische Heterogenität durch die autokatalytische Genexpression eines Transporters auftreten kann und von der Transportermenge in der Membran abhängig ist, wurde bereits für den Lac-Transporter (LacY) (Mitrophanov & Groisman, 2008) und Ara-Transporter (AraE) (Khlebnikov *et al.*, 2000; Siegele & Hu 1997) in *E. coli* gezeigt, dessen Aufbau und Funktion ähnlich zum Xylose-Operon aus *B. megaterium* sind (Ozbudak *et al.*, 2004). Aufgrund dessen wurde auch in dieser Arbeit die Untersuchung der autokatalytischen Genexpression des Transporters in *B. megaterium* als mögliche Ursache für phänotypische Heterogenität durchgeführt.

1.5.1.2 Ungleiche Verteilung von Zellkomponenten während der Zellteilung in Abhängigkeit von stochastischen Effekten und des Zellpolalters

Ungleiche Verteilung durch stochastische Effekte

Zellkomponenten befinden sich verteilt im Zytoplasma und werden zufällig (stochastisch) während der Zellteilung auf die Tochterzelle verteilt. Dabei werden Zellkomponenten, die in geringerer Anzahl vorliegen, stochastisch ungleichmäßiger auf die Tochterzellen verteilt als Zellkomponenten, die in großer Anzahl vorliegen. Die ungleiche Verteilung von Zellkomponenten während der Zellteilung ist eine häufige Ursache für phänotypische Heterogenität (Jahn *et al.*, 2015).

Bei Plasmiden, die in geringer Plasmidkopienzahl in der Zelle vorkommen, besteht eher die Wahrscheinlichkeit ungleich auf die Tochterzellen verteilt zu werden als bei Plasmiden, die in hoher Kopienzahl vorkommen. Durch die ungleiche Verteilung der Plasmide kann sich die Gendosis bestimmter Gene auf dem Plasmid zwischen den Zellen unterscheiden (Friebs, 2004). Folglich kann es phänotypisch zu einem heterogenen Verhalten der Zellen kommen (Jahn *et al.*, 2015). Je höher die Kopienzahl, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass zumindest ein Plasmid oder im Idealfall die Plasmide gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt werden (Friebs, 2004). Bereits beschriebene Modelle gehen sogar davon aus, dass bei einer

Plasmidkopienzahl von 50 und mehr pro Zelle eine 100 %ige Stabilität gegeben ist (Bentley & Kompala, 1989).

Unter der Plasmidkopienzahl versteht man die durchschnittliche Anzahl an Plasmiden pro Zelle bzw. pro Chromosom (Friebs, 2004). Hierbei unterscheidet man zwischen low-copy Plasmiden mit einer Kopienzahl zwischen 1 - 12, medium-copy Plasmide mit Kopien von 15 - 20 pro Zelle und high-copy Plasmide, die 20 - 700 Plasmide pro Zelle enthalten können (Mayer, 1995). Diese Unterschiede folgen aus den verschiedenen Replikationsursprüngen (*ori*) der Plasmide (Boros *et al.*, 1984; Müller *et al.*, 1995). High-copy Plasmide werden bevorzugt für die Produktion von rekombinanten Proteinen eingesetzt, da in den meisten Fällen eine hohe Genkopienzahl zu einer hohen Produktion des entsprechenden Proteins führt (French & Ward, 1996). Der Einsatz von low-copy Plasmiden kommt bevorzugt bei der Produktion von Proteinen vor, die für den Wirt toxisch sein können (Müller *et al.*, 1996).

Die autonome Replikation der Plasmide erfolgt nach dem rolling circle- oder θ -Mechanismus und benötigt den *ori* selbst, das Replikationsinitiator-Protein (Rep) und Proteine, die an der Kontrolle der Replikation beteiligt sind. Diese genetischen Elemente unterscheiden sich und werden als unterschiedlich „stark“ angesehen, wodurch die entsprechende Kopienzahl resultiert.

Die Regulation der Plasmid-Replikation kann durch anti-sense RNA, Repressoren sowie durch Iterons gesteuert werden. Anti-sense RNAs können die mRNA wichtiger Replikationsproteine binden, so dass die Translation gehemmt ist, wodurch die Replikation der Plasmide verringert wird. Repressoren können die Transkription von *rep*-Genen verhindert, deren Genprodukte für die Replikationsinitiation benötigt werden. Iterons sind direkt wiederholende Sequenzen und dienen als Bindestelle für das Rep-Protein. Gebundene Rep-Proteine stehen nicht mehr für die Replikationsintiation zur Verfügung und limitieren somit die Plasmidkopienzahl. Außerdem kann auch die Größe eines Plasmids Einfluss auf die Replikation haben, sodass größere Plasmide schlechter repliziert werden als kleinere (del Solar *et al.*, 1998).

Außerdem spielt der *ori* auch eine Rolle bei der sogenannten Plasmidstabilität. Der Begriff Stabilität wird in strukturelle und segregative Stabilität unterteilt. Die strukturelle Stabilität bezieht sich auf den Erhalt der richtigen Sequenz nach der Replikation der Plasmide und kann durch Insertionen, Deletionen oder

Punktmutationen gestört werden. Die segregative Stabilität bezeichnet die Weitergabe der Plasmide auf die Tochterzelle und bezieht sich meistens auf den weit verbreiteten Begriff „Plasmidstabilität“ (Bentley & Kompala, 1989).

Probleme mit der Plasmidstabilität können durch eine Reihe von Maßnahmen verbessert werden und als Ansatz für die Untersuchung der phänotypischen Heterogenität dienen. Dazu gehören zum Beispiel die Erhöhung der Plasmidkopienzahlen für eine verbesserte zufällige Weitergabe der Plasmide, die aktive Verteilung von Plasmiden durch „partitioning“ (par)-Systeme und die Vermeidung von plasmidfreien Zellen durch Toxin-Antitoxin-Systeme. Durch eine Integration des entsprechenden Gens in das Chromosom kann die Problematik der Plasmidstabilität sogar vollständig umgangen werden (Boyd *et al.*, 2000).

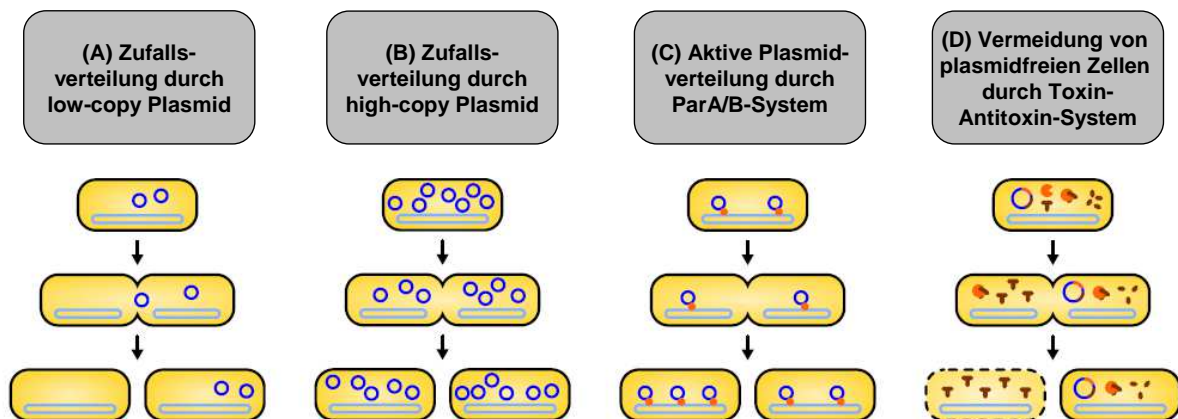


Abb. 7: Schematische Darstellung von Maßnahmen zur Verbesserung der Plasmidstabilität. (A) Eine geringe Plasmidkopienzahl führt im Vergleich zu einer (B) hohen Plasmidkopienzahl zu einer ungleichmäßigeren Verteilung der Plasmide auf die Tochterzelle während der Zellteilung, da die Plasmide zufällig verteilt werden. (C) Durch aktive Plasmidverteilung mittels *parA/B*-System und (D) Vermeidung von plasmidfreien Zellen mittels Toxin-Antitoxin-System kann die Plasmidstabilität verbessert werden (verändert nach Jahn *et al.*, 2015).

Abb. 7 A zeigt, dass eine geringe Plasmidkopienzahl zu einer ungleichmäßigeren Verteilung der Plasmide auf die Tochterzelle führt, was letztendlich zu plasmidfreien Zellen führen kann. Existieren in einer Population plasmidfreie und -haltige Zellen resultieren heterogene Phänotypen hinsichtlich rekombinanten Proteinen, wenn das betreffende Gen Plasmid-basiert vorliegt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Zellen einer eGfp („enhanced green fluorescent protein“)-produzierenden *P. putida*-Population unterschiedliche Anzahlen von Plasmiden besaßen, was sich in einem heterogenen Phänotyp mit starken und schwächeren eGfp-Produzieren widerspiegelte. Demnach enthielt die stark eGfp-produzierende Subpopulation eine

höhere Anzahl an Plasmiden als die wenig eGfp-produzierende Subpopulation (Jahn *et al.*, 2014).

Da der Verlust von Plasmiden, als Träger genetischer Informationen, für die Bakterienzellen einen Nachteil bedeutet, brachte die Evolution bestimmte Mechanismen hervor, die eine verbesserte Verteilung von DNA gewährleisteten. Diese Systeme können für die aktive und gleichmäßige Verteilung der Plasmide auf die Tochterzelle benutzt werden. Hierfür sind bestimmte Genregionen, die *par* („partitioning“) -Regionen, notwendig, die die gerichtete Weitergabe der Plasmide an die Tochterzellen gewährleisten. Das *par*-System wurde bereits erfolgreich in *E. coli* und *Corynebacterium glutamicum* eingesetzt (Pinto *et al.*, 2012; Okibe *et al.*, 2013). Das Plasmid-basierte *parS*-ParA-ParB System enthält eine *parS*-Bindestelle, die durch das Protein ParB gebunden wird. Der Plasmid-ParB Komplex wird dann durch das Protein ParA mit dem Chromosomen oder der Membran verbunden (Hayes & Austin, 1994). Jedes gebundene Plasmid bewegt sich entlang einer bestimmten Region des Chromosoms, wodurch die Plasmide gleichmäßig entlang des replizierenden Chromosoms verteilt werden. So ist gewährleistet, dass sich die Plasmide während der Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilen (Jahn *et al.*, 2015)

Eine andere Methode, um Plasmid-freie oder -arme Zellen zu verhindern, ist das Plasmid-basierte Toxin-Antitoxin-System (TA-System) (Kroll *et al.*, 2010). Hierbei wird die Plasmidstabilität durch zwei Gene bewirkt. Ein Gen codiert für ein stabiles Toxin, wie beispielsweise DNA-Restriktionsenzyme oder porenbildende Enzyme, das andere Gen codiert für ein instabiles Antitoxin, das das Toxin inaktivieren kann. Kommt es nun zu einer ungleichen Verteilung der Plasmide, so kann in den Plasmid-armen Zellen kein instabiles Antitoxin nachproduziert werden. Das stabile Toxin hingegen verbleibt in den Plasmid-freien oder -armen Zellen und zerstört diese durch DNA-Verdau mittels Restriktionsenzymen oder durch Poren in der Zellmembran. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass das TA-System in *Ralstonia eutropha* zu einer 96-stündigen 100 %igen Aufrechterhaltung der Plasmidkopienzahl führte (Gruber *et al.*, 2014).

Auf der anderen Seite ermöglicht die Integration des gewünschten Gens in das Chromosom die sichere Weitergabe der rekombinanten Gene auf die Tochterzelle und das Umgehen der Plasmidstabilität-Problematik. Für *E. coli* steht für diesen Zweck eine Reihe von Vektoren zur Verfügung, die die Chromosomintegration

bestimmter Gene ermöglichen (Peredelchuk & Bennett, 1997). Ein Nachteil der Integrationsmethode ist das Vorhandensein nur einer einzigen Genkopie. Die niedrige Gendosis kann zu einer geringeren Produktivität solcher Systeme im Vergleich zu plasmidbasierten Expressionssystemen führen (Overton, 2014).

Aber nicht nur Plasmide werden während der Zellteilung zufällig auf die Tochterzellen verteilt, sondern auch andere Zellkomponente wie zum Beispiel Proteine, die sich in der Zelle befinden. Stochastische Verteilungseffekte spielen in Bakterien eine große Rolle, da viele essentielle zelluläre Prozesse durch eine kleine Anzahl von regulatorischen Molekülen, wie Transkriptionsfaktoren, vermittelt werden. Eine ungleichmäßige Verteilung dieser regulatorischen Moleküle während der Zellteilung kann zu signifikanten Unterschieden in der Transkription und Translation zwischen den einzelnen Zellen einer Population führen (Kearns, 2005). Dabei besteht wieder die Wahrscheinlichkeit, dass Proteine, die in geringer Anzahl in der Zelle vorkommen, ungleichmäßiger verteilt werden als Zellkomponenten mit hoher Anzahl (Jahn *et al.*, 2015).

Neben den stochastischen Verteilungseffekten existiert noch ein weiterer Aspekt, der zu einer ungleichen Verteilung von Zellkomponenten und somit zu heterogenen Phänotypen führt. Hierbei handelt es sich um eine einseitige Verteilung aufgrund einer bestimmten räumlichen Organisation bestimmter Proteine, die zum Beispiel Membran-, Granula- oder Nukleoid-gebunden vorliegen oder sich einseitig am Zellpol akkumulieren (Wettmann *et al.*, 2014). Dadurch wird eine freie Diffusion durch das Zytoplasma verhindert, so dass die Zellkomponenten während der Zellteilung nicht gleichmäßig auf die entstehenden Tochterzellen verteilt werden. Desweiteren konnten auch „sterische Effekte“ in *E. coli* beobachtet werden, bei denen eine gleichmäßige Plasmidverteilung in der Zelle durch den Nukleoid gestört wurde. Dadurch wurden die Plasmide während der Zellteilung ungleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt (Reyes-Lamothe *et al.*, 2014).

Außerdem wird vermutet, dass bestimmte äußere Einflüsse eine phänotypische Heterogenität hervorrufen können, die nicht im Zusammenhang mit einer stochastischen ungleichen Verteilung oder mit einer bestimmten räumlichen Anordnung in der Zelle, sondern mit einer Überlebensstrategie bei schlechten Bedingungen stehen. Am Beispiel von Polyhydroxyfettsäuren, ein Polymer, das von Bakterien als Reservestoff für Kohlenstoff genutzt wird, wurde gezeigt, dass äußere

Einflüsse zu heterogenen Phänotypen führten. Hierbei wurde der Reservestoff in einem Teil einer *Cupriavidus necator*-Population unter extrem hohen und damit schädlichen Kohlenstoffkonzentrationen abgebaut (Wiacek *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu konnte bei sehr geringen Kohlenstoffkonzentrationen gezeigt werden, dass der Reservestoff sehr ungleichmäßig auf die Zellen verteilt wurde (Ratcliff & Denison, 2010). Zellen die eine hohe Menge Polyhydroxyfettsäuren enthielten, verweilten in einer Art Ruhestadium und hatten demnach einen Vorteil unter mangelnden Kohlenstoffbedingungen, während Zellen mit wenig Polyhydroxyfettsäuren unter diesen Bedingungen zwar gefährdet waren, aber bei sich verbesserndem Nährstoffangebot konkurrenzfähiger erschienen (Ratcliff & Denison, 2011).

Ungleiche Verteilung in Abhängigkeit des Zellpolalters

Die ungleiche Verteilung von Zellkomponenten wurde auch schon in Verbindung mit dem Zellpolalter einer Zelle diskutiert (Lindner *et al.*, 2008; Winkler *et al.*, 2010; Boehm *et al.*, 2016). In *E. coli* wurde gezeigt, dass Zellen einen „alten“ und „neuen“ Zellpol besitzen (Stewart *et al.*, 2005). Nach jeder Zellteilung wird ein neuer Zellpol an der Teilungsebene geformt. Ein Zellpol kann daher ein bestimmtes Alter haben, was mit jeder Zellteilung steigt. Dadurch sind in Bakterien-Populationen bestimmte Altersstrukturen vorhanden (Charlesworth, 1994). Es ist bekannt, dass Zellen mit älteren Zellpolen eine verminderte Wachstums- und Teilungsrate besitzen (Stewart *et al.*, 2005). Außerdem wurde bereits gezeigt, dass das Alter des Zellpols in Verbindung mit der Zellgröße (Bergmiller & Ackermann, 2011), mit der Akkumulation von Glykogen (Boehm *et al.*, 2016) und missgefalteten Proteinen (Proteinaggregate) (Lindner *et al.*, 2008; Winkler *et al.*, 2010) am Zellpol gebracht werden kann. Dabei fand die Akkumulation bevorzugt am älteren Zellpol statt. Durch die Akkumulation von Zellkomponenten in Abhängigkeit des Alters der Zellpole können heterogene Phänotypen entstehen (Lindner *et al.*, 2008). Abb. 8 zeigt schematisch die Entstehung von Zellen mit alten und neuen Zellpolen.

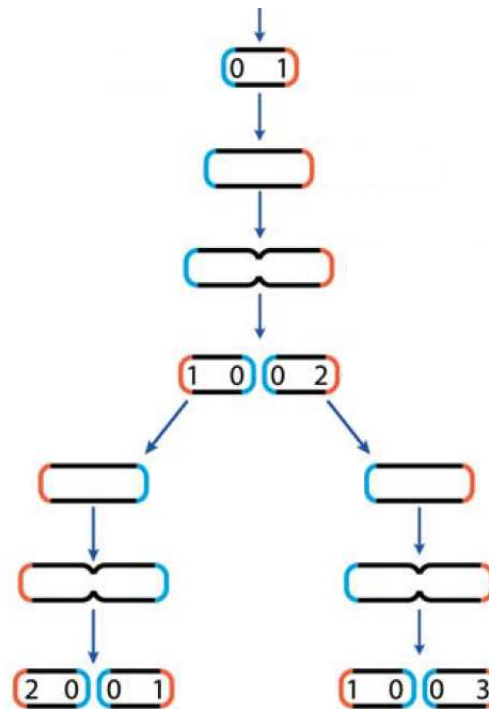


Abb. 8: Schematisches Modell über die Entstehung von unterschiedlich alten Zellpolen während der Zellteilung. Während jeder Zellteilung entsteht ein neuer Zellpol (blau) an der Teilungsebene. Der ältere Zellpol (rot) geht aus der vorherigen Zellteilung hervor. Die Nummern in den Polen geben die Anzahl der Zellteilungen, die der entsprechende Pol bereits durchlaufen hat, wieder. Die Zahlen in den Polen stellen somit das unterschiedliche Polalter der Zellen dar. Das Zellalter der Ausgangszelle ist unbekannt und wird schematisch mit „1“ bezeichnet (verändert nach Stewart *et al.*, 2005).

Abb. 8 zeigt, dass nach einer Zellteilung eine der dabei entstehenden Zellen als alternde Mutterzelle, die den älteren Zellpol erbt, gesehen werden kann, während die andere Zelle als verjüngte Tochterzelle angenommen werden kann, die den Zellpol erbt, der erst in der letzten Teilung gebildet wurde.

Bisher konnte nicht geklärt werden, wie und warum Bakterien die Altersstruktur der Population für die Entstehung heterogener Phänotypen nutzen (Lindner *et al.*, 2008; Boehm *et al.*, 2016).

1.5.2 Vorteile der phänotypischen Heterogenität

Die phänotypische Heterogenität zeigt, dass die Annahme über die unimodale Verteilung eines bestimmten Parameters innerhalb einer Population, nicht zutrifft. Sie zeigt, dass in einer isogenen Population, die gleichen Umweltbedingungen ausgesetzt ist, phänotypische Unterschiede zwischen den einzelnen Zellen auftreten können. Die phänotypische Heterogenität liefert dabei in vielen Bereichen einen Vorteil oder Nutzen, den ein einzelner Phänotyp nicht hervorbringen könnte.

Bakterien sichern sich das Überleben ihrer Art, indem sie sich an wechselnde Umweltbedingungen, wie Temperatur, pH-Wert, Nährstoffangebot oder das Auftreten von Antibiotika und Toxinen, anpassen. Ändern sich die Umweltbedingungen zu schnell, kann dies auch zum Sterben der Bakterien führen (Beaumont *et al.*, 2009). Um solche Herausforderungen zu meistern haben Bakterien Strategien entwickelt, indem sie verschiedene Phänotypen generieren, die bei plötzlich wechselnden Bedingungen besser angepasst sein können und dadurch überleben. Der Teil der Bakterien, der weniger angepasst ist, hat dann zwar eine geringere Überlebenschance, aber das Überleben der Art ist durch diese Strategie gewährleistet. Dieses Phänomen wird auch als „bet-hedging“ bezeichnet und beschreibt die Strategie „nicht alles auf eine Karte zu setzen“. Aus der Sicht der Evolution betrachtet, stellt bet-hedging nicht die übliche Anpassung an die Umgebung dar, bei der sich Bakterien mit vorteilhaften Mutationen durchsetzen. Vielmehr handelt es sich um eine Strategie, bei der eine genetisch identische Population unterschiedlich gut an die Umweltbedingungen angepasst ist (Beaumont *et al.*, 2009). Dabei ist ein Teil der Population an die bestehenden Umweltbedingungen optimal angepasst, während der restliche Teil weniger vorteilhaft angepasst ist. Bei einer schnellen und dramatischen Änderung der Umwelt, können letztere so aber plötzlich im Vorteil sein (Philippi & Seger, 1989).

Der evolutionäre Vorteil des bet-hedging ist dabei umso größer, je drastischer und unvorhersehbarer sich die Bedingungen ändern. 2009 war es Wissenschaftlern sogar gelungen, das bet-hedging unter Laborbedingungen zu beobachten. Eine *Pseudomonas fluorescens*-Population wurde rasch wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt und entwickelte die Fähigkeit, auch ohne zusätzliche Mutationen, unterschiedliche Phänotypen hervorzubringen. Diese neue Lebensstrategie sicherte den Erhalt des Bakterienstammes (Beaumont *et al.*, 2009). Für diesen Versuch wurden *Pseudomonas*-Stämme ständig wechselnden ungeschüttelten und geschüttelten Kulturbedingungen ausgesetzt, die sich zuvor an eine der beiden Bedingungen optimal angepasst hatten. Durch den regelmäßigen und plötzlichen Wechsel zwischen ungeschüttelt und geschüttelt entstanden innerhalb kurzer Zeit zwei verschiedene Phänotypen, die den gleichen Genotyp hatten und in der rasch ändernden Umwelt überleben konnten. Ein Genotyp, der gleichzeitig mehrere Phänotypen hervorbringt, kann schneller und besser auf plötzliche ändernde Umweltbedingungen reagieren (Beaumont *et al.*, 2009).

Ein weiteres Beispiel für einen Vorteil durch phänotypische Heterogenität bietet die *fliC*-Expression in *Salmonella typhimurium*. Dieses Gen codiert für ein Protein, was unter anderem für die Synthese der Flagellen benötigt wird. Für diesen Versuch wurde *gfp* unter die Kontrolle des *fliC*-Promotors in das Genom von *S. typhimurium* integriert. Es wurde ermittelt, dass die *gfp*-Expression in den einzelnen Zellen stark variierte. Der Hypothese zur Folge kann eine schwankende *fliC*-Expression innerhalb der Zelle einen Vorteil für den Organismus verschaffen. Denn nachdem mit Hilfe der Flagellen eine Infektion des Gewebes des Wirtes erfolgt war, wurden diese vom Immunsystem des Wirtes erkannt und lösten eine Immunantwort aus. Durch das Einstellen der *fliC*-Expression konnte die Immunantwort reduziert werden und sicherte das Überleben der Art (Freed *et al.*, 2008).

Evolutionär betrachtet, gibt es neben dem bet-hedging auch noch eine zweite Strategie, die das Auftreten von verschiedenen Phänotypen vorteilhaft macht. Dabei kann ein Phänotyp durch das Auftreten eines anderen Phänotyps profitieren. Beispielsweise kann ein Phänotyp ein beliebiges Substrat produzieren, das der andere Phänotyp zum Überleben braucht. Diese Strategie wird auch als „division of labor“ bezeichnet und konnte bisher zum Beispiel in der Formation von Biofilmen und beim programmierten Zelltod beobachtet werden (Crespi, 2001). Außerdem wurde das Phänomen von „division of labor“ auch bei *S. typhimurium* vermutet. Hierbei unterschied man zwischen zwei Subpopulationen, wobei nur eine infektiös auf den Darm des Wirtes wirkte. Die nicht-infektiöse Subpopulation profitierte von der Infektion, da diese zu einer Reduzierung der konkurrierenden Kommensale im Darm führte (Freed *et al.*, 2008).

1.5.3 Phänotypische Heterogenität in verschiedenen Organismen

Heterogenes Verhalten eines Phänotyps wurde bereits in zahlreichen Bakterien und in den unterschiedlichsten Bereichen, wie Morphologie, Zusammensetzung der Zellkomponenten und Wachstum beschrieben (Levy, 2016). Im Folgenden werden einige bedeutsame Beispiele phänotypischer Heterogenität in bekannten Bakterien dargestellt.

1.5.3.1 Persistenz in *Staphylococcus aureus*

Die erste dokumentierte phänotypische Heterogenität reicht bis in das Jahr 1944 zurück und wurde in *S. aureus* entdeckt. In einer Gemeinschaft von Bakterien einer Art, die ursprünglich aus einer Zelle entstanden war (isogenen Population), wurde eine sehr kleine Subpopulation entdeckt, die in Gegenwart eines Antibiotikums (Penicillin) überleben konnte. Diese Zellen werden auch als Persister bezeichnet. Der restliche Teil der isogenen *S. aureus*-Population zeigte hingegen ein sensitives Verhalten gegen das Antibiotikum (Bigger, 1944).

Weitere Studien und Erkenntnisse über Persister wurden in *E. coli* durchgeführt und erforscht. Hierzu wurde eine Mutante genutzt, die eine Veränderung im *hip*-Gen (Toxingen) besaß, wodurch eine höhere Anzahl an Persister-Zellen auftrat, was die Untersuchungen vereinfachte (Moyed & Bertrand, 1983). Mit Hilfe der *hip*-Mutanten wurde gezeigt, dass ein Teil der Population spontan in einen Zustand übergehen konnte, in dem keine Zellteilung mehr stattfand. Keren *et al.* brachten die Expression des Toxin-codierenden *hip*-Gens in den Zusammenhang mit inhibierten Teilungs- und Zellprozessen, wie Translation (Keren *et al.*, 2004). Durch das Einstellen der Zellteilung entkommen die Persister der Behandlung mit Antibiotikum, da diese oft in Zellteilungsprozesse eingreifen. Durch die Entwicklung von wachsenden und nicht-wachsenden Subpopulationen sind Bakterien in der Lage, auch in Gegenwart eines Antibiotikums zu überleben (Balaban *et al.*, 2004).

Das Toxin (HipA) und das zugehörige Antitoxin (HipB) sind in einer positiven Feedbackschleife involviert, die zu einer Entwicklung von Subpopulationen von wachsenden und nicht-wachsenden Zellen führen kann. Das Antitoxin (HipB) wirkt dem Toxin (HipA) entgegen und ist im Vergleich zum Toxin (HipA) instabil. Außerdem fungiert es als Repressor für *hipAB*. Ein zufälliges Absinken der Antitoxin- oder Ansteigen der Toxin-Konzentration durch „Rauschen“ in der Genexpression führt zu einer Toxin-Akkumulation, was die Inhibierung von Teilungs- und Zellprozessen und somit das Einstellen des Zellwachstums zur Folge hat. Außerdem kommt es durch das Absinken der Antitoxin-Konzentration zu einer Derepression von *hipAB*, was wiederum zu einem Anstieg des Toxins führte. Dieser Feedbackmechanismus kann zu einer ungleichen Akkumulation von Toxin und Antitoxin führen, die bei Erreichen eines Schwellenwertes die Persistenz auslösen oder das Wachstum fortsetzen (Keren *et al.*, 2004).

1.5.3.2 Laktoseverwertung und Colicin-Produktion in *Escherichia coli*

In einer isogenen *E. coli*-Population wurde 1953 entdeckt, dass die Gene des *lac*-Operons (Kapitel 1.3) nach Induktion mit Laktose nur in einem Teil der Population exprimiert wurden. Da noch keine geeigneten Messmethoden für die Untersuchung auf Einzelzellebene zur Verfügung standen, wurde ein Phagen-basierter Versuchsansatz gewählt. Dabei wurde eine definierte Anzahl an *E. coli*-Zellen mit Phagen infiziert, die daraufhin lysierten und das Enzym β -Galaktosidase freisetzen, das im Überstand quantifiziert werden konnte. Dabei fiel auf, dass in jedem Versuch das Verhältnis von freigesetztem Enzym zu lysierten Zellen stark variierte. Daraus wurde geschlossen, dass die einzelnen Zellen der isogenen Population unterschiedliche Mengen an β -Galaktosidase produzierten (Benzer, 1953).

Im Jahr 1957 folgten weitere intensive Studien über dieses Verhalten und dessen Ursachen. Sie begründeten die ungleiche β -Galaktosidase-Produktion mit der sogenannten autokatalytischen Genexpression des Transporters (Kapitel 1.5.1.1) (Novick & Weiner, 1957).

Auch in einer nicht-induzierten Kultur enthalten die Zellen durch eine zufällige und spontane Induktion sehr geringe Menge des Transporters LacY in ihrer Membran. Diese geringen Mengen variieren von Zelle zu Zelle durch Rauschen in der Genexpression (Kapitel 1.5.1.1) und unterliegen auch einer Art „Verdünnungseffekt“ durch die Zellteilung. Dadurch können einige Zellen auch wieder ihren Transporter „verlieren“, bevor sie eine ausreichende Menge des Induktors aufnehmen konnten, um das Operon, darunter *lacY*, zu exprimieren. Diese Zellen zeigen folglich den „nicht-induzierten Phänotyp“. Dass ein Teil der Zellen so viel Induktor akkumulieren kann, dass der *lac*-Promotor induziert wird, bevor sie ihre Permease „verlieren“, hängt von der extrazellulären Konzentration des Induktors ab und von der Anzahl der Transportermoleküle in der Membran vor Induktion. Die Zellen, die durch ausreichend akkumulierten Induktor induziert wurden, produzieren weitere Transporter, die wiederum den Induktor in die Zelle transportieren, was letztendlich zur maximalen Expression des Transportergens führt (autokatalytische Genexpression des Transporters). Außerdem enthalten diese Zellen auch nach Zellteilung eine ausreichende Menge von Transportermolekülen in der Membran, um ausreichend Induktor aufzunehmen, der zur Expressierung des Operons führt. Diese Zellen zeigen dann den „induzierten Phänotyp“ (Novick & Weiner, 1957).

Die Zusammensetzung des Mediums bzw. die Wahl des Induktors haben ebenfalls eine große Bedeutung in Bezug auf die Heterogenität. Frühere Studien zeigten, dass die Bistabilität verstärkt während der Kultivierung mit Succinat und artifiziellen Induktoren, wie Thiomethyl-D-Galaktopyranosid (TMG) oder Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) auftrat (Narang & Pilyugin, 2008). TMG und IPTG werden als künstliche Induktoren für das *lac*-Operon verwendet und bietet den Vorteil, dass sie durch die β -Galaktosidase nicht verstoffwechselt und somit auch nicht verbraucht werden. Außerdem wird die cAMP-Konzentration durch die Aufnahme der künstlichen Induktoren nicht beeinflusst (Kapitel 1.3), so dass diese Induktoren auch in Gegenwart von Glukose das Operon induzieren können. Succinat wurde lediglich als Energiequelle hinzugefügt, da die artifiziellen Induktoren, im Gegensatz zum natürlichen Induktor Laktose (Allolaktose), zwar das Operon induzieren können, aber nicht als Energiequelle dienen. Das heterogene Verhalten wurde in der Literatur mit einer Destabilisierung des Systems beschrieben, in der ein Teil der autokatalytischen Genexpression des Transporters, die ungleiche Akkumulation des Induktors, verstärkt wird. Die autokatalytische Genexpression eines Transporters stellt eine häufige Ursache für heterogenes Verhalten dar (Kapitel 1.5.1.1). Die Kultivierung mit TMG/Succinat führte zu einer starken intrazellulären Akkumulation des artifiziellen Induktors, da er nicht durch die β -Galaktosidase gespalten wurde. Die starke Akkumulation förderte wiederum die Synthese der Permease, wodurch mehr TMG in die Zelle aufgenommen und das Vorhandensein von unterschiedlichen intrazellulären Induktor-Konzentrationen gefördert wurde. Diese stark ausgeprägte, positive Schleife ist bei der Kultivierung mit Laktose geschwächt, da die β -Galaktosidase die intrazelluläre Laktose (Allolaktose) metabolisiert und dadurch die Synthese der Permease verschlechtert. Ein homogenes Verhalten mit Laktose als Induktor kann durch eine hohe Laktose-Konzentration begünstigt werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Bistabilität verstärkt bei Induktoren auftrat, die durch die β -Galaktosidase nicht verstoffwechselt werden können (Narang & Pilyugin, 2008).

Aktuell zeigten auch Binder *et al.* in *E. coli*, dass eine beabsichtigte gleichmäßige Akkumulation des Induktors IPTG zu einem homogenen Phänotyp führte. Sie veränderten den Indukter chemisch (6-Nitropiperonal (NP)-IPTG), so dass er ohne Transporter durch Diffusion über die Zellmembran in die Zelle gelangte und erst mit Hilfe von Licht seine aktive Form annahm („photocaged Inducer“). Die aktive Form

war nun in der Lage, den Promotor zu induzieren. Durch diese Technik konnte sich in jeder Zelle der Population die Menge an Induktor akkumulieren, die zur Aktivierung der Transkription erforderlich war. Nach der Lichtinduktion zeigte der Phänotyp homogenes Verhalten (Binder *et al.*, 2014).

Ein weiteres klassisches Beispiel für phänotypische Heterogenität in *E. coli* wurde 2007 genauer beschrieben und zeigte das Auftreten einer „suizidalen“ Subpopulation. Dabei produzieren 3 % der isogenen *E. coli*-Population das Toxin Colicin, das Nährstoff-konkurrierende Stämme töten soll. Die Colicin-Produktion führt zum Sterben dieser Subpopulation, wodurch dieses Phänomen auch als „bomber“ (Selbstmordattentäter)-Phänotyp bezeichnet wird. Der restliche Teil der *E. coli*-Population produziert kein Colicin und ist resistent gegen das Toxin. Obwohl 3 % der *E. coli*-Population durch die Colicin-Produktion sterben, kann der *E. coli* Stamm so den Kampf um das Nährstoffangebot gewinnen und sich weiter vermehren, während konkurrierende Stämme sterben. Mrak *et al.* entdeckten, dass der Masterregulator der SOS-Antwort, LexA, die Expression des *cka*-Gens, das für Colicin codiert, reguliert. LexA ist ein Repressor, der die Transkription der Gene für die SOS-Antwort bei DNA-Schäden verhindert, solange die DNA intakt ist. Ein inaktiver LexA-Repressor führte zur Expression des *cka*-Gens. Sie führten die Bistabilität in der *cka*-Expression auf die Basalaktivität der SOS-Antwort und auf stochastische Faktoren zurück (Mrak *et al.*, 2007).

1.5.3.3 Kompetenz, Sporulation, Kannibalismus, Motilität und Biofilmbildung in *Bacillus subtilis*

Die phänotypische Heterogenität tritt auch mit zahlreichen Beispielen in *B. subtilis* auf. Hierbei ist oft ein bestimmter Masterregulator für das Schicksal der Subpopulationen verantwortlich. Das bekannteste Beispiel für heterogenes Verhalten einer isogenen Population ist die Entwicklung der genetischen Kompetenz in *B. subtilis*. Eine Subpopulation von lediglich 10 – 20 % verfügt in der stationären Phase über eine ausreichende Menge des Masterregulators ComK, der für die Regulierung der Kompetenzgene verantwortlich ist und für die Entwicklung der Kompetenz erforderlich ist. Diese Zellen sind dann in der Lage fremde DNA aufzunehmen, während der Rest dieser Population nicht kompetent wird (Maamar & Dubnau, 2005).

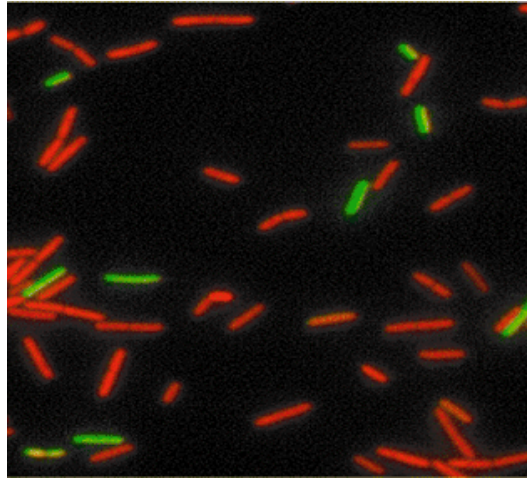


Abb. 9: Bistabilität in *B. subtilis*. Der *B. subtilis*-Stamm mit einer *comK-gfp*-Fusion zeigt wenige kompetente Zellen in der stationären Phase durch die grüne Fluoreszenz des Gfp an. Die Nukleinsäure aller Zellen wurde gefärbt (rot), um auch nicht-kompetente Zellen sichtbar zu machen (verändert nach Dubnau & Losick, 2006).

ComK ist positiv autoreguliert und bindet als Dimer an seinen Promotor (P_{comK}) und erfüllt somit zwei Bedingungen für phänotypische Heterogenität, die positive Feedbackschleife und die nichtlineare Antwort des Regulators (Kapitel 1.5.1.1) (Hamoen *et al.*, 1998). Durch das Rauschen in der Expression von *comK* werden die Zellen zufällig ausgewählt, die die Fähigkeit zur Kompetenz entwickeln. Dabei handelt es sich um Zellen, in der die ComK-Konzentration durch zufälliges Rauschen höher ist und durch die positive Autoregulation weiter akkumuliert. Oberhalb eines bestimmten Schwellenwerts von ComK werden die Gene für die Kompetenzentwicklung aktiviert, während Zellen, die ComK unterhalb des Schwellenwerts besitzen nicht kompetent werden. Eine hohe ComK-Konzentration wirkt sich negativ auf die Synthese von ComS auf, ein kleines Protein, das die Degradation von ComK verhindert. Je weniger ComS in den kompetenten Zellen vorhanden ist, desto mehr ComK wird abgebaut (Hahn *et al.*, 1994). Durch diesen Mechanismus verlieren kompetente Zellen auch wieder die Fähigkeit zur DNA-Aufnahme (Süel *et al.*, 2006).

Es konnte auch experimentell gezeigt werden, dass die positive Feedbackschleife des Masterregulators ComK für die Ausbildung heterogener Phänotypen verantwortlich ist, in dem P_{comK} durch einen IPTG-induzierbaren Promotor ersetzt wurde, der keinerlei positiven Autoregulation unterlag, wodurch die positive Feedbackschleife unterbrochen wurde. Daraufhin zeigten alle Zellen der Population ein homogenes Verhalten (Maamar & Dubnau, 2005).

Des Weiteren konnte ein heterogenes Verhalten während der Sporulation in *B. subtilis* entdeckt werden. Unter nährstoffarmen Bedingungen wird in einem Teil der isogenen Population die Sporulation aktiviert. Der dabei entstehende Zelltyp, die Spore, ist resistent gegen Umweltstress und kann auch bei mangelndem Nährstoffangebot überdauern. Der Eintritt in die Sporulation erfolgt durch die Aktivierung bzw. Phosphorylierung des Masterregulators Spo0A. Nur die Zellen, in denen Spo0A aktiviert wird, sind in der Lage, Sporen auszubilden (Spo0A-ON Zellen). Der restliche Teil der Population verbleibt im vegetativen Zustand (Spo0A-OFF-Zellen) (Chung *et al.*, 1994; Smits *et al.*, 2006). Bei der Ausbildung der Bistabilität spielt die positive Feedbackschleife wieder eine bedeutende Rolle. Das aktivierte und phosphorylierte Spo0A~P stimuliert die Synthese des alternativen Sigmafaktors σ^H , worauf *spo0A* selbst und Gene transkribiert werden, deren Genprodukte für die Phosphorylierung von Spo0A verantwortlich sind. Dieser Kreislauf stimuliert die Synthese und die Phosphorylierung von Spo0A und führt durch Schwankungen in der Konzentration einzelner Komponenten zu heterogenem Verhalten. Der Vorteil eines bistabilen Verhaltens in Bezug auf die Sporulation wird oft im Zusammenhang mit dem hohen Energieaufwand für den Sporulationsprozess betrachtet. Außerdem ist die Sporenentwicklung in einem frühen Stadium irreversibel, so dass nur die Spo0A-OFF-Zellen bei plötzlich verbessertem Nährstoffangebot in der Lage sind, weiter zu wachsen (Dubnau & Losick, 2006).

In diesem Zusammenhang wurde auch der Kannibalismus von *B. subtilis* entdeckt. Dieser beschreibt ein Verhalten, bei dem die Formation einer Endospore, die durch Nährstoffmangel hervorgerufen wird, nochmals hinausgezögert werden kann, obwohl der eigentliche Sporulationsprozess bereits eingeleitet worden ist. Dafür werden von Spo0A-ON-Zellen spezifische Toxine und Immunitätsproteine sekretiert. Die Subpopulation der Spo0A-OFF-Zellen ist nicht immun gegen das Toxin und beginnt zu lysieren. Durch die Aufnahme der durch die Zelllyse freigesetzten Nährstoffe können die Spo0A-Zelle letztendlich die Sporulation nochmals verzögern. Diese Verzögerung bietet den Vorteil, dass der energie- und zeitaufwendige Sporulationsprozess solange verhindert werden kann, bis ein verbessertes Nahrungsangebot zur Verfügung steht (González-Pastor *et al.*, 2003; Ellermeier *et al.*, 2006; González-Pastor, 2011).

Ein weiteres heterogenes Verhalten liefert die Motilität von *B. subtilis* in der exponentiellen Wachstumsphase. Während dieser Wachstumsphase besteht die

Population aus aktiv schwimmenden sowie nicht-motilen Zellen. Dies spiegelt sich auch in der Zellmorphologie wider, die bewegliche einzelne Zellen und unbewegliche längere Ketten zeigt. Der Masterregulator der Motilität ist der alternative Sigmafaktor σ^D , der die Transkription von Genen für die Flagellum-Synthese kontrolliert. Außerdem reguliert dieser Sigmafaktor die Transkription von Genen für zellwandabbauende Enzyme, die aus langen Ketten einzelne Zellen hervorbringt (Mirel & Chamberlin, 1989). Schwimmende Zellen werden demnach auch als σ^D -ON-Zellen und nicht-bewegliche Zellen als σ^D -OFF-Zellen bezeichnet. Anders als bei ComK (Masterregulator für Kompetenz) und Spo0A (Masterregulator für Sporulation) ist das bistabile Verhalten hier nicht auf die autoregulierte Transkription der Gene zurückzuführen, sondern viel mehr durch Faktoren, die die Aktivität und Stabilität des Masterregulators σ^D beeinflussen (Skerker & Laub, 2004). Diese Art von Bistabilität wurde als Vorteil in der Besetzung unterschiedlicher biologischer Nischen interpretiert. Die unbeweglichen Zellen (σ^D -OFF-Zellen) sitzen in einer bestimmten Nische fest, die sie optimal nutzen können, während die schwimmenden Zellen (σ^D -ON-Zellen) neue Nischen mit anderen Bedingungen besetzen können (Skerker & Laub, 2004).

Phänotypische Heterogenität wurde außerdem während der Biofilmbildung in *B. subtilis* entdeckt. Hierbei unterdrückt der Masterregulator SinR die Expression der Gene, die für die Biofilmbildung notwendig sind. Dabei handelt es sich um das *epsA*-Operon, das für Enzyme codiert, die für die Bildung des Hauptbestandteils der extrazellulären Matrix, die Exopolysaccharide, benötigt werden, und das *yqxM-sipW-tasA*-Operon, das für das Protein TasA codiert, das für den Zusammenhalt des Biofilms notwendig ist. Die Derepression beider Operons wird durch den Antirepressor SinI vermittelt, der aber nur in einem Teil der Zellen einer Population produziert wird, so dass nicht alle Zellen die Biofilmbildung eingehen (Branda *et al.*, 2001; Branda *et al.*, 2006).

Das Repressorgen *sinI* ist unter der Kontrolle des Sporen-Masterregulators Spo0A, der, wie oben bereits beschrieben, nur in einem Teil der Population aktiv ist (Spo0A-ON). Es wurde gezeigt, dass dieser Zusammenhang dazu führt, dass SinI nur in einem Teil der Population als Antirepressor für SinR fungiert. In Spo0A-ON-Zellen ist SinI aktiv und inaktiviert den Repressor SinR, so dass *epsA*- und *yqxM-sipW-tasA*-Operon transkribiert werden, was folglich zur Biofilmbildung führt (Chai *et al.*, 2008).

1.5.3.4 Heterologe Proteinproduktion in *Bacillus megaterium*

2007 wurde die phänotypische Heterogenität während der heterologen rekombinanten Gfp-Produktion in *B. megaterium* beobachtet (Biedendieck *et al.*, 2007 b). Im Rahmen der Entwicklung und Etablierung der Plasmid-basierten Xylose-induzierbaren Gfp-Produktion in *B. megaterium* wurden Zellen aus einer Bioreaktorkultivierung mittels „fluorescence-activated cell sorting“ (FACS)-Analyse untersucht. Dabei fiel auf, dass zwei Subpopulationen existierten, die einen unterschiedlichen Phänotyp zeigten. Die FACS-Analyse ergab, dass nur 70 % der untersuchten Zellen fluoreszierten, die anderen 30 % zeigten keine oder eine sehr schwache Fluoreszenz. Die Untersuchung der phänotypischen Heterogenität kann aus industrieller und wirtschaftlicher Sicht von Bedeutung sein, da die 30 % der Nicht-Produzierer zwar das Nährstoffangebot nutzen, aber kein rekombinantes Zielprotein produzieren und somit eine Last für den gesamten Prozess darstellen. Das Verständnis der Heterogenität könnte zu einer Produktionssteigerung von 30 % führen und ist daher von industrieller Bedeutung.

Einige Ursachen für phänotypische Heterogenität in *B. megaterium* während der heterologen Gfp-Produktion wurden bereits untersucht (Münch *et al.*, 2015) und im Rahmen dieser Doktorarbeit weiter analysiert.

2. ZIELSETZUNG

Rekombinante Proteinproduktion mit *Bacillus megaterium* wird seit vielen Jahren mit Derivaten des über den Repressor XylR kontrollierten Promotors des Operons für die Gene der Xyloseverwertung gesteuert. Dabei sind die molekularen Grundlagen der Genrepression durch XylR bisher unverstanden. Gleichzeitig wurde beobachtet, dass nicht alle Bakterien einer Protein-produzierenden Bakterienkultur das gewünschte Zielprotein bilden. Diese ökonomisch bedeutende Kulturheterogenität ist ebenfalls nur ansatzweise untersucht. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit diese beiden Aspekte zur Xylose-induzierbaren Genexpression untersucht.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Produktion beider XylR-Formen (mit und ohne Xylose) etabliert werden, um dann damit DNA-Bindungsstudien mittels der Gelretardations- und Footprint-Techniken durchzuführen. Daraus sollte dann ein Modell der Xylose-Regulation in *B. megaterium* erstellt werden (Kapitel 4.1).

Im zweiten Teil der Arbeit sollten unterschiedliche Mechanismen zur Entstehung von phänotypischer Heterogenität analysiert werden. Hierbei sollte die Proteinproduktion mit *B. megaterium* und davon abgeleiteter Mutanten mit unterschiedlichen Plasmidsystemen, die verschiedene Replikationsursprünge haben, untersucht werden. Ein Einfluss von Wirtsgenen und von Plasmidstrukturen auf die phänotypische Heterogenität sollte so bestimmt werden (Kapitel 4.2).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte und Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Chemikalien, Enzyme und Kits sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 1: Geräteliste.

Geräte	Modell / Zubehör	Hersteller
Agarosegelelektrophoresekammer	Agagel Mini	Biometra
Autoklav	LVSA 50/70 LVSA	Zirbus
Blauschirm	Flu-O-blu	Biozym
Chemilumineszenz-Dokumentationsanlage	CoolSNAP HQ ²	Photometrix
Flowcytometer	Cube8	Partec
Fluoreszenzspektrometer	LS50B	Perkin Elmer
Geldokumentationsanlage	DeVision DBox	Decon Science Tec
Kugelmühle	FastPrep [®] -24 Homogenisator	MP Biomedical
Mikro-Bioreaktorsystem	BioLector [®]	M2p-labs
Mikroskope	Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M	Carl Zeiss AG
	Axioskop	
pH-Meter	CGH842	Schott
Photometer	Ultrospec 2000	GE Healthcare
	Nanodrop ND-1000	Peqlab Biotechnology GmbH
Pipetten	Research Reference	Eppendorf
Reinstwasseranlage	Milli-Q System	Millipore
Schüttler	TR-150	Infors AG
SDS-Gelelektrophoresekammer	Mini Protean III System	Bio-Rad
Thermocycler	T personal	Bimetra
	CFX96 [™] Real-Time System/ C1000 [™]	Biorad

Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf
Ultraschallhomogenisator	Sonoplus UW2070 (Sonotrode MS72)	Bandelin
UV-Crosslinker	UV Stratalinker 2400	Stratagene
UV-Tisch	UV Transilluminator	Wealtec Europe
Vortex	Reax 2000	Heidolph
Waagen	SBA52	Scaltec
	BP615	Sartorius
Wippschüttler	PMR-30	Grant-bio
Zentrifugen	Avanti J-30I (Rotor: JLA 9.1000)	Beckman Coulter
	Biofuge fresco	Heraeus (Thermo Scientific)
	Centrifuge Minispin	Eppendorf
	Centrifuge 5804	Eppendorf
	Megafuge 1.0R	Heraeus (Thermo Scientific)

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien, Enzyme und Kits.

Produkt / Anwendung	Name / Beschreibung	Hersteller
Affinitätsmaterial	Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare
Antikörper	Anti-Digoxigenin-AP Antikörper, Fab-Fragment, polyklonal	Roche
	Maus Anti-His Antikörper, monoklonal	Thermofisher Scientific
	Maus Anti-XylR Antikörper, monoklonal	Antibody Facility, TU Braunschweig
	Ziege Anti-Maus-AP sekundärer Antikörper, polyklonal	Sigma-Aldrich
	Ziege Anti-Maus sekundärer Antikörper, Alexa Fluor 568, polyklonal	Thermofisher Scientific
Benzonase	Benzonase Nuclease, Purity > 90 %	Merck
Blotmembran	Nylonmembran, positiv geladen	Roche

3. Material und Methoden

	Nylonmembran Nytran N	GE Healthcare
Blottpapier (Whatmanpaper)	Gel-Blotting-Papier (150 mm)	Neolab
Chemilumineszenzsubstrat	CDP-Star	Roche
DNA-Fluoreszenzfarbstoff	Gel Star® Nucleic Acid Gel Stain	Lonza
DNA-Labeling Kit	DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit, 2 nd generation	Roche
DNA-Ligase	T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
DNA-Marker	Gene Ruler™	Fermentas
DNA-Polymerasen	Taq	Biotherm
	Phusion	New England Biolabs
DNA-Reinigungskits	QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
	QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
	QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
DNA-Verdau	DNase (2 U/μL)	Ambion
Entwicklerlösungen für Röntgenfilm	Adefofix Fixierkonzentrat Part 1	Adefo-Chemie GmbH
	Härtelösung X für Fixierbäder	
	Citroline2000 Entwicklerkonzentrat	
Oligonukleotide	diverse	Biomers
		Thermo Fisher Scientific
Proteinmarker	Protein Molecular Weight Marker	Fermentas
Restriktionsenzyme	diverse	New England Biolabs
Röntgenfilm	Röntgenfilm Fuji Super RX	Fuji
Sequenzierungskit	Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit	usb

Nicht explizit aufgeführte Reagenzien und Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), GE Healthcare (München, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), SERVA (Heidelberg, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) und AppliChem (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

3.2 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit eingesetzten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 3: Eingesetzte Bakterienstämme.

Name	Beschreibung	Herkunft
<i>E. coli</i> Stämme		
BL21(DE3) Star TM pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdSB (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm me131</i> (DE3) pLysS (Cam ^r)	Invitrogen
C43(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Sigma-Aldrich
DH10B TM	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu) 7697 galU galK rpsL nupG λ⁻</i>	Invitrogen
<i>B. megaterium</i> Stämme		
DSM319	Wildtyp	DSMZ, Braunschweig (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig)
WH321	<i>lacZ⁻ xylR::kan^r</i>	(Rygus & Hillen, 1992)
WH377	<i>lacZ⁻ xylT::ery^r</i>	(Schmiedel <i>et al.</i> , 1997)
<i>B. subtilis</i> Stämme		
168	<i>trpC2</i>	(Burkholder & Giles, 1947)
JH642 P _{<i>xylA</i>} - <i>gfp</i>	<i>trpC2 pheA1 amyE::P_{<i>xylA</i>}-gfp-cam^r</i>	Persönliche Gabe, E. Härtig, TU Braunschweig

Tabelle 4: Eingesetzte Plasmide. Bei den Shuttlevektoren handelt es sich um Plasmide zur Klonierung in *E. coli* (Amp^r) und zur rekombinanten Proteinproduktion in *B. megaterium* (Tet^r).

Name	Beschreibung	Herkunft
Kontrollvektor ohne Testgen		
pMM1520	Shuttlevektor zur Expression von rekombinanten Genen unter der Kontrolle des nativen Xylose-inzumbierbaren Promotors (P _{<i>xylA</i>} - <i>mcs</i>).	(Malten <i>et al.</i> , 2005)

Shuttlevektoren zur Analyse des Einflusses unterschiedlicher Replikationsursprünge auf die rekombinante Proteinproduktion in <i>B. megaterium</i>		
p3Stop1623hp	Shuttlevektor zur Expression von rekombinanten Genen unter der Kontrolle des optimierten Xylose-inzubierbaren Promotors; P_{xyIA}^{opt} - <i>mcs-3stop-codons</i> , <i>oriU</i> / <i>repU</i> aus pBC16 (<i>B. cereus</i>).	(Stammen <i>et al.</i> , 2010)
pSSBm85	p3Stop1623hp-Derivat, Insertion von PCR-Fragment <i>gfp</i> über BglII und EagI; P_{xyIA}^{opt} - <i>gfp</i> , <i>oriU</i> / <i>repU</i> aus pBC16 (<i>B. cereus</i>).	(Stammen <i>et al.</i> , 2010)
pRBBm63	Shuttlevektor zur Expression von <i>gfp</i> unter der Kontrolle des nativen Xylose-inzubierbaren Promotors; P_{xyIA} - <i>gfp</i> , <i>oriBM100</i> / <i>repBM100</i> aus pBM100 (<i>B. megaterium</i>).	R. Biedendieck, 2006
pSWBm9	pRBBm63-Derivat, Insertion von P_{xyIA}^{opt} geschnitten aus pSSBm85 über EcoNI und NheI, <i>oriBM100</i> / <i>repBM100</i> aus pBM100 (<i>B. megaterium</i>).	diese Arbeit
pHT10gfp	Shuttlevektor zur Expression von <i>gfp</i> in <i>B. subtilis</i> unter Kontrolle des <i>lac</i> -Promotors; P_{lac} - <i>gfp</i> , <i>oriA</i> / <i>repA</i> aus pBS72 (<i>B. subtilis</i>).	Mobitec GmbH, Göttingen
pSWBm14	pSSBm85-Derivat, Insertion von PCR-Fragment <i>oriA</i> / <i>repA</i> aus pBS72 (<i>B. subtilis</i>) amplifiziert aus pHT10gfp über NsiI / PstI und AflII.	diese Arbeit
pUCTV2	Shuttlevektor mit Temperatur-sensitiven origin, <i>oriF</i> / <i>repF</i> aus pE194 (<i>S. aureus</i>).	(Wittchen & Meinhardt, 1995)
pSWBm16	pSSBm85-Derivat, Insertion von PCR-Fragment <i>oriF</i> / <i>repF</i> aus pE194 (<i>S. aureus</i>) amplifiziert aus pUCTV2 über NsiI und AflII.	diese Arbeit
pMGBm21	Shuttlevektor, <i>oriBM700</i> / <i>repBM700</i> aus pBM700 (<i>B. megaterium</i>).	Persönliche Gabe, R. Biedendieck, TU Braunschweig
pSWBm17	pSSBm85-Derivat, Insertion von PCR-Fragment <i>oriBM700</i> / <i>repBM700</i> aus pBM700 (<i>B. megaterium</i>) amplifiziert aus pMGBm21 über NsiI / PstI und AflII.	diese Arbeit
pRBBm309	pSSBm85-Derivat, Insertion von PCR-Fragment <i>ilvk</i> amplifiziert aus genomischer DNA von DSM319 über AgeI und SphI	N. Langreder, 2016
Shuttlevektor zur Analyse eines konstitutiven Promotors in <i>B. megaterium</i>		
pRBBm258	pSSBm85-Derivat, Insertion von PCR-Fragment des konstitutiven Promotors $P_{bmd_{1326}}$ amplifiziert aus genomischer DNA von DSM319 über AflII und SpeI.	Persönliche Gabe, R. Biedendieck, TU Braunschweig
Shuttlevektoren zur Analyse eines instabilen Testgens (<i>gfp</i>) in <i>B. megaterium</i>		

pKH70	Vektor zur Expression von <i>egfp-LVA</i> unter der Kontrolle des <i>rovA</i> -Promotors.	K. Herbst, 2011
pSWBm21	p3Stop1623hp-Derivat, Insertion von PCR-Fragment <i>egfp-LVA</i> amplifiziert aus pKH70 über BglII und EagI.	diese Arbeit
Shuttlevektoren zur Analyse des Einflusses des <i>xyIR</i>-Gens auf die rekombinante Proteinproduktion in <i>B. megaterium</i>		
pKMMBm1	pSSBm85-Derivat, Insertion von XmaI- und KpnI-Schnittstelle am 5'- bzw. 3'- Ende von <i>xyIR</i> .	(Münch <i>et al.</i> , 2015)
pKMMBm5	pKMMBm1-Derivat, Deletion von <i>xyIR</i> über XmaI und KpnI und Religation.	(Münch <i>et al.</i> , 2015)
<i>E. coli</i>-Vektoren für die Produktion von <i>XylR_{B.meg}</i> und Antikörpergenerierung gegen <i>XylR_{B.meg}</i>		
pET14b	Vektor zur Expression von rekombinanten Genen in <i>E. coli</i> (Amp ^r) mit N-terminalen His ₆ -Tag unter der Kontrolle des T7-Promotors.	Novagen, Darmstadt
pRBec2	pET14b-Derivat, Insertion von PCR-Fragment <i>xyIR_{B.meg}</i> amplifiziert aus genomischer DNA von DSM319 über BamHI, fusioniert mit N-terminalen <i>his₆</i> .	Persönliche Gabe, R. Biedendieck, TU Braunschweig
pSWEc10	pET14b-Derivat, Insertion von PCR-Fragment <i>hemC_{B.meg}</i> amplifiziert aus genomischer DNA von DSM319 über BamHI, fusioniert mit N-terminalen <i>his₆</i> .	diese Arbeit
pET52b(+)	Vektor zur Expression von rekombinanten Genen in <i>E. coli</i> (Amp ^r) mit N-terminalen StreptII-Tag und C-terminalen His ₁₀ -Tag unter der Kontrolle des T7-Promotors.	Novagen, Darmstadt
pSWEc8	pET52b(+)-Derivat, Insertion von <i>xyIR_{B.meg}</i> geschnitten aus pRBec2 über BamHI, fusioniert mit N-terminalem <i>streptII</i> .	diese Arbeit
pSWEc9	pET52b(+)-Derivat, Insertion von PCR-Fragment <i>xyIT_{B.meg}</i> amplifiziert aus genomischer DNA von DSM319 über NotI und NcoI, fusioniert mit C-terminalen <i>his₁₀</i> .	diese Arbeit

3.3 Kulturmedien und Zusätze

3.3.1 Vollmedium für *Escherichia coli* und *Bacillus megaterium*

Falls nicht anders angegeben, wurden *E. coli* und *B. megaterium* Kulturen in LB-Medium kultiviert (Sambrook & Russell, 2001). Für Festmedien wurde 1,5 % (w/v) Agar-Agar vor dem Autoklavieren zusätzlich hinzugegeben.

Vollmedium nach „lysogeny broth“ (LB)

Trypton	1,0	% (w/v)
Hefeextrakt	0,5	% (w/v)
NaCl	0,5	% (w/v)

3.3.2 Minimalmedium M9 für *Escherichia coli*

Das Minimalmedium M9 (Miller, 1972) wurde in den Vor- und Hauptkulturen für die Produktion des Xylose-Repressors XylR_{B.meg} ohne gebundene Xylose verwendet.

Minimalmedium M9 nach Miller

10 x M9-Salze	100	mL
MgSO ₄ (1 M)	2	mL
CaCl ₂ (100 mM)	1	mL
<ul style="list-style-type: none"> mit H₂O auf 980 mL auffüllen und autoklavieren, 20 mL Fruktose (30 % (w/v), steril filtriert) nach dem Autoklavieren steril hinzufügen 		

10 x M9-Salze

Na ₂ HPO ₄	423	mM
KH ₂ PO ₄	220	mM
NH ₄ Cl	187	mM
NaCl	86	mM

3.3.3 Minimalmedium A5+4 für *Bacillus megaterium*

Das Minimalmedium A5+4 (Malten *et al.*, 2005) wurde in den Vor- und Hauptkulturen bei Flowcytometer-Analysen und bei Messungen im BioLector[®] eingesetzt.

Minimalmedium A5+4 nach Malten

Fruktose 30 % (w/v), steril filtriert	100	mL
10 x Pufferstammlösung	100	mL
8 x Grundlösung	100	mL
Spurenelemente 1	1	mL
Spurenelemente 2	1	mL
<ul style="list-style-type: none"> mit sterilem H₂O_{deion.} auf 1000 mL auffüllen 		

10 x Pufferstammlösung

KH ₂ PO ₄	259	mM
Na ₂ HPO ₄	408	mM
<ul style="list-style-type: none"> autoklavieren 		

8 x Grundlösung

(NH ₄) ₂ SO ₄	151,0 mM
MgSO ₄	12,1 mM
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
<ul style="list-style-type: none"> mit H₂O_{deion.} auf 800 mL auffüllen und autoklavieren 	

Spurenelemente 1

MnCl ₂	202 mM
CaCl ₂	360 mM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	2 mM
CoCl ₂	11 mM
<ul style="list-style-type: none"> steril filtrieren 	

Spurenelemente 2

FeSO ₄	9 mM
<ul style="list-style-type: none"> steril filtrieren 	

3.3.4 Medienzusätze

Die Medienzusätze wurden als konzentrierte Stammlösungen angesetzt, sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren dem auf unter 50 °C abgekühlten Medium unter sterilen Bedingungen zugesetzt. In der folgenden Tabelle 5 sind die verwendeten Medienzusätze angegeben.

Tabelle 5: Verwendete Medienzusätze.

Medienzusatz	Bakterienstamm	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	<i>E. coli</i>	100 mg/mL in H ₂ O _{deion.}	100,0 µg/mL
Carbenicillin	<i>E. coli</i>	100 mg/mL in H ₂ O _{deion.}	100,0 µg/mL
Chloramphenicol	<i>B. megaterium</i>	34 mg/mL in 70 % (v/v) Ethanol	4,5 µg/mL
	<i>B. subtilis</i>		
	<i>E. coli</i>		34,0 µg/mL
IPTG	<i>E. coli</i>	1 M in H ₂ O _{deion.}	400,0 µM
Tetrazyklin	<i>B. megaterium</i>	5 mg/mL in 70 % (v/v) Ethanol, dunkel lagernd	10,0 µg/mL
Xylose	<i>B. megaterium</i>	50 % (w/v)	0,5 % (w/v)
	<i>B. subtilis</i>		

3.4 Mikrobiologische Techniken

3.4.1 Sterilisation

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Medien und Puffer für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck dampfsterilisiert. Temperaturempfindliche Substanzen wurden sterilfiltriert (Porendurchmesser des Filters: 0,2 µm).

3.4.2 Plattenkulturen von Bakterien

Zum Anlegen einer Plattenkultur wurden Bakterien aus einer Glycerinkultur mit einer sterilen Impföse entnommen und fraktioniert auf einer LB-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37 °C ü.N. wurden die Platten mit Parafilm abgedichtet und konnten für etwa eine Woche (*B. megaterium*) bzw. für bis zu vier Wochen (*E. coli*) bei 4 °C gelagert werden.

3.4.3 Flüssigkulturen von Bakterien

Für Vorkulturen wurden 50 mL Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen in 300 mL Schikanekolben verwendet, die mit einer Einzelkolonie einer Plattenkultur angeimpft wurden. Die Inkubation erfolgte für 14 - 15 h bei 100 rpm und 37 °C. Die Hauptkulturen wurden, wenn nicht anderes angegeben, im Verhältnis 1:100 im 500 mL Schikanekolben mit 100 mL Medium (für *B. megaterium*) und im 1000 mL Schikanekolben mit 500 mL Medium (für *E. coli*) mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz angeimpft. Hierfür wurden die Übernachtskulturen zunächst für 10 - 15 min bei 250 rpm aufgeschüttelt. Die Inkubation der Hauptkulturen erfolgte dann bei 37 °C und 220 rpm.

3.4.4 Lagerung von Bakterien

Die längerfristige Lagerung der Bakterien erfolgte als Glycerinkulturen. Hierfür wurden 650 µL der entsprechenden Bakterienkultur in der exponentiellen Phase mit 350 µL 87 %igem (v/v) Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

3.4.5 Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zelldichte einer Flüssigkultur erfolgte über photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm. Bei OD_{578 nm}-Werten > 1,0 wurden entsprechende Verdünnungen der Kulturen vermessen. Eine OD_{578 nm} von 1 entspricht 10⁹ Zellen/mL bei *E. coli* und 10⁷ Zellen/mL bei *B. megaterium*.

3.5 Molekularbiologische Methoden

Das Standardwerk für die meisten der beschriebenen molekularbiologischen Methoden war Sambrook und Russel (2001). Modifikationen der dort angegebenen Methoden sind im Folgenden beschrieben.

3.5.1 Herstellung und Transformation CaCl₂-kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Herstellung

Für die Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen wurden zunächst 5 mL LB-Medium in einem Kulturröhrchen mit einer Einzelkolonie vom entsprechenden *E. coli*-Stamm angeimpft und bei 37 °C ü.N. bei 180 rpm im Schüttler inkubiert. Ausgehend von dieser Vorkultur wurde dann eine 100 mL LB-Flüssigkultur in 500 mL Schikanekolben im Verhältnis 1:100 angeimpft und schüttelnd bei 37 °C bis zu einer OD_{578 nm} von 0,6 - 0,8 inkubiert. Die Zellernte und alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4 °C und unter sterilen Bedingungen. Die abgekühlte Zellsuspension wurde zentrifugiert (3000 × g, 10 min) und der Überstand vollständig abgenommen. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig in 10 mL eiskalter Resuspensionslösung aufgenommen und anschließend für 15 min bei 4 °C gekühlt. Der Ansatz wurde dann erneut zentrifugiert (3000 × g, 10 min) und das Zellsediment in 1 mL eiskalter Resuspensionslösung aufgenommen. Zuletzt wurden die Zellen in gekühlten Eppendorf-Reaktionsgefäßen aliquotiert und sofort bei -80 °C eingefroren.

Transformation

Für die Transformation wurden 1 µL fertige Plasmid-DNA (20 – 200 ng/µL) bzw. 5 µL Ligationsansatz mit 50 µL kompetenten Zellen vorsichtig vermischt. Der Ansatz wurde für 20 min auf Eis inkubiert, dann erfolgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C.

Nach einer weiteren Inkubation für 2 min auf Eis wurde dem Transformationsansatz 300 µL LB zugegeben. Nach Inkubation für 1 h bei 37 °C und 750 rpm im Thermomixer wurde der gesamte Ansatz auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert.

Resuspensionslösung

CaCl ₂	100 mM
Glycerin	10 % (v/v)

3.5.2 Herstellung und Transformation von *Bacillus megaterium*-Protoplasten

Herstellung

Für die Herstellung von *B. megaterium*-Protoplasten wurden 50 mL LB-Medium in 300 mL Schikanekolben mit einer Übernachtskultur des entsprechenden *B. megaterium*-Stamms im Verhältnis 1:50 inokuliert und bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Bei einer OD_{578 nm} von 0,8 – 1,0 wurden die Zellen zentrifugiert (3000 × g, 4 °C, 10 min). Das Zellsediment wurde in 5 mL frisch hergestellter SMMP-Lösung resuspendiert und in ein 15 mL Falcon-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 100 µL Lysozym-Lösung (200 mg/mL in SMMP-Lösung) und Inkubation bei 37 °C erfolgte die Protoplastierung. Die Bildung der Protoplasten wurde dabei mikroskopisch kontrolliert. Die protoplastierten Zellen wurden zentrifugiert (1306 × g, RT, 10 min) und das erhaltene Zellsediment in 5 mL SMMP-Lösung vorsichtig aufgenommen. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (1306 × g, RT, 10 min), das Zellsediment wieder vorsichtig in 5 mL SMMP-Lösung resuspendiert und mit 750 µL 87 %igem (v/v) Glycerin versetzt. Zuletzt wurden die Protoplasten zu je 500 µL aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Transformation

Für die Transformation von Protoplasten wurden ausschließlich Lösungen mit RT verwendet. 500 µL Protoplasten wurden zu 10 µL DNA (90-200 ng/µL) gegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren durchmischt. Die Protoplasten-Suspension wurde dann zu 1,5 mL PEG-P pipettiert, vorsichtig vermischt und dann für 2 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 5 mL SMMP-Lösung und sehr vorsichtigem Mischen wurde zentrifugiert (1306 × g, RT, 10 min). Der Überstand wurde direkt nach der Zentrifugation verworfen und das

Protoplastensediment in 500 µL SMMP vorsichtig resuspendiert. Dann wurde für 45 min bei 30 °C ohne Schütteln und danach für 45 min bei 30 °C und 300 rpm im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz zu 2,5 mL vorbereiteten und auf maximal 43 °C erwärmten CR5-Topagar gegeben. Der Topagar mit den Zellen wurde auf eine LB-Agar-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum gegeben und verteilt. Nach Inkubation ü.N. bei 30 °C wurde die Platte auf Kolonien überprüft, welche daraufhin frisch auf eine neue Agar-Platte ausgestrichen wurden.

2 x AB3 (Antibiotic Medium No. 3)

AB3 (von Difco) 35,0 g/L

- autoklavieren

2 x SMM

Maleinsäure 40 mM

NaOH 80 mM

MgCl₂ × 6H₂O 40 mM

Saccharose 1 M

- Bestandteile in angegebener Reihenfolge in H₂O_{deion.} lösen und steril filtrieren

SMMP-Lösung

2 x AB3 und 2 x SMM zu gleichen Teilen mischen

PEG-P

PEG-6000 40,0 % (w/v)

- in 1 x SMM lösen und autoklavieren

Lösung A

Saccharose 602 mM

MOPS 58 mM

NaOH 30 mM

- steril filtrieren

Lösung B

Agar 14,04 g/L

Casamino-Acids 700,00 mg/L

Hefe-Extrakt 35,09 g/L

- autoklavieren

8 x CR5-Salze

K ₂ SO ₄	11,5	mM
MgCl ₂ × 6H ₂ O	393,5	mM
KH ₂ PO ₄	2,9	mM
CaCl ₂	158,6	mM

- autoklavieren

CR5-Topagar (für 2,5 mL-Portionen)

Lösung A	1,25	mL
Lösung B	713,00	µL
8 x CR5-Salze	288,00	µL
12 % (w/v) Prolin	125,00	µL
20 % (w/v) Glukose	125,00	µL

3.5.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden 5,5 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Einzelkolonie angeimpft und für 16 – 20 h bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Die *E. coli*-Kulturen wurden durch Zentrifugation geerntet (18000 × g, 2 min) und das Zellsediment vollständig in 300 µL Puffer-P1 resuspendiert. Danach wurden 300 µL Puffer-P2 zugesetzt, vorsichtig gemischt und für maximal 2 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 300 µL Puffer-P3 und vorsichtigem Mischen wurde der Proteinniederschlag abzentrifugiert (18000 × g, 15 min). Der Überstand wurde vollständig abgenommen, mit 600 µL Isopropanol versetzt und gut geschüttelt. Die präzipitierte Plasmid-DNA wurde abzentrifugiert (18000 × g, 15 min) und der Überstand verworfen. Nach einem Waschschriff mit 400 µL 70 %igem (v/v) Ethanol wurde erneut zentrifugiert (18000 × g, 5 min) und die sedimentierte DNA bei 70 °C im Thermomixer getrocknet. Das Sediment wurde anschließend in 50 µL 70 °C heißem, sterilem H₂O_{deion.} aufgenommen, gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

Die für die Transformation von *B. megaterium* verwendeten Plasmide wurden mittels QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen gewonnen. Hierfür wurde das vom Hersteller angegebene Protokoll verwendet. Abweichend wurde das Zellsediment aus 2 x 5,5 mL Kultur pro Säule verwendet. Außerdem wurden 70 µL 70 °C heißes, steriles H₂O_{deion.} statt 1 min für 10 min bei RT auf der Säule inkubiert und anschließend eluiert.

Puffer P1 (Resuspensionspuffer)

Tris-HCl, pH 8,0	50	mM
EDTA	10	mM
RNase A	100	mg/L

Puffer P2 (alkalischer Lysispuffer)

NaOH	200	mM
SDS	1	% (w/v)

Puffer P3 (Äquilibrationpuffer)

Kaliumacetat	3	M
--------------	---	---

- pH mit Essigsäure auf 5,5 einstellen

3.5.4 Präparation genomischer DNA aus *Bacillus megaterium*

Zur Präparation von genomischer DNA aus *B. megaterium* wurden 10 mL LB-Medium, mit entsprechendem Antibiotikum, im 100 mL Schikanekolben mit einer Einzelkolonie angeimpft und für 16 – 20 h bei 150 rpm und 37 °C inkubiert. Ausgehend von dieser Kultur wurden 6 mL durch Zentrifugation geerntet (18000 × g, 2 min) und das Zellsediment vollständig in 300 µL TE(H)-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C für 30 min inkubiert. Danach wurden 300 µL Puffer-P2 zugesetzt, vorsichtig gemischt und für maximal 2 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 300 µL Puffer-P3 und vorsichtigem Mischen wurde der Proteinniederschlag abzentrifugiert (18000 × g, 15 min). Der Überstand wurde vollständig abgenommen, mit 600 µL Isopropanol versetzt und gut geschüttelt. Die präzipitierte DNA wurde abzentrifugiert (18000 × g, 15 min) und der Überstand verworfen. Nach einem Waschschriff mit 400 µL 70 %igem (v/v) Ethanol wurde erneut zentrifugiert (18000 × g, 5 min) und die sedimentierte DNA bei 70 °C im Thermomixer getrocknet. Das Sediment wurde anschließend in 50 µL 70 °C heißem, sterilem H₂O_{deion.} aufgenommen, gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

TE(H)-Puffer (Resuspensionspuffer)

Tris-HCl, pH 8,0	150	mM
EDTA	20	mM
Lysozym	30	µg/mL

Puffer P2 (alkalischer Lysispuffer)

NaOH	200	mM
SDS	1	% (w/v)

Puffer P3 (Äquilibriumspuffer)

Kaliumacetat

3 M

- pH mit Essigsäure auf 5,5 einstellen

3.5.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration einer Plasmid-Lösung erfolgte durch den Nanodrop ND 1000 (Peglab Biotechnology GmbH). Die DNA-Konzentration wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm und zur Kontrolle auf Proteinverunreinigungen bei 280 nm bestimmt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine A_{260} von 1,0 näherungsweise einer dsDNA-Konzentration von 50 mg/mL entspricht. Die Reinheit der DNA ergab sich aus dem Quotienten zwischen A_{260} und A_{280} , wobei ein Quotient von $\frac{A_{260}}{A_{280}} \geq 1,8$ reiner DNA entspricht.

3.5.6 DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, um bestimmte DNA-Abschnitte *in vitro* zu vervielfältigen. Zunächst wird die Template-DNA (Plasmid- oder genomische DNA) mittels Hitze denaturiert (Denaturierung). Im Anschluss lagern sich die Primer, die komplementär zu den Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts sind, bei einer Temperatur zwischen 50 und 55 °C an die Template-DNA an (Annealing). Dabei ist die gewählte Annealingtemperatur abhängig von der Sequenz des einzusetzenden Primers. Ausgehend vom 3'-Ende der Primer synthetisiert die DNA-Polymerase einen neuen DNA-Strang (Elongation). Die Dauer der Elongation hängt von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Stranges sowie von der eingesetzten Polymerase ab. Denaturierung des Templates, Annealing und Elongation laufen wiederholt nacheinander während einer PCR ab (zwischen 29-34 Zyklen).

In dieser Arbeit wurde die Phusion[®] High Fidelity Polymerase (New England Biolabs) und die Taq Polymearse (New England Biolabs oder Biotherm) verwendet. Die eingesetzten Primer wurden von den Firmen Biomers und Life Technologies bezogen. Der Deckel des Thermocyclers (Tpersonal, Biometra) wurde vor dem Start auf 105 °C erhitzt. Nach jeder PCR wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft, ob das gewünschte PCR-Produkt erfolgreich amplifiziert wurde. In Tabelle 6 und Tabelle 7 sind die PCR-Zusammensetzungen, die PCR-Programme und die verwendeten Oligonukleotide aufgelistet.

Tabelle 6: PCR-Zusammensetzung und PCR-Programme für die Phusion- und Taq-Polymerase.

	PCR-Zusammensetzung und Pipettierschema		PCR-Programm	
			Temperatur	Dauer
Phusion	Template			
	Plasmid-DNA (2-4 ng/μL)	2,0 μL		
	Genom. DNA (0,6-3 ng/μL)	2,0 μL	98 °C	30 s
	Primer 1 fw (10 pmol/μL)	1,0 μL	98 °C	10 s
	Primer 2 rv (10 pmol/μL)	1,0 μL	50-55 °C	20 s
	5 x Puffer	4,0 μL	72 °C	30 s / kb
	dNTPs (10 mM)	0,4 μL	72 °C	10 min
	Polymerase (2000 U/mL)	0,2 μL		
	H ₂ O _{deion.}	11,4 μL		
Taq	Template			
	Plasmid-DNA (2-4 ng/μL)	2,0 μL		
	Genom. DNA (0,6-3 ng/μL)	2,0 μL	94 °C	60 s
	Primer 1 fw (10 pmol/μL)	2,0 μL	94 °C	30 s
	Primer 2 rv (10 pmol/μL)	2,0 μL	50-55 °C	60 s
	10 x Puffer	2,0 μL	72 °C	60 s / kb
	dNTPs (10 mM)	0,5 μL	72 °C	10 min
	Polymerase (5000 U/mL)	0,2 μL		
	H ₂ O _{deion.}	11,3 μL		

Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide für die PCR. Die Schnittstelle des Restriktionsenzymys ist in der Primersequenz unterstrichen. Die Abkürzungen „fw“ (vorwärts) und „rv“ (rückwärts) beschreiben die Orientierung des Primers in der PCR-Amplifikation.

Primer	Verwendungszweck	Primersequenz (5'-3')
Primer für die Konstruktion von Vektoren mit unterschiedlichen Replikationsursprüngen		
Primer SW38fw	Amplifizierung von <i>oriA</i> / <i>repA</i> für pSWBm14	atc <u>actg</u> cagatccacctaacggaatctc
PrimerSW39rv		atc <u>actta</u> agatcgatgaatttgataatg
PrimerSW40fw	Amplifizierung von <i>repF</i> / <i>oriF</i> für pSWBm16	atca <u>atg</u> catacgcagcgcacacacgc
PrimerSW41rv		atc <u>actta</u> agagagtgtcttgtgacac
PrimerSW36fw	Amplifizierung von <i>oriBM700</i> / <i>repBM700</i> für pSWBm17	atc <u>actg</u> cagtgatgaagtcgactcc
PrimerSW37rv		atc <u>actta</u> agtacgcagtcataaacgg
Primer für die Bestimmung der Plasmidkopienzahl (PCN)		

PrimerRB267fw	Amplifizierung von <i>gfp</i> für die Bestimmung der PCN	gtcagtggagaggggtgaagg
PrimerRB268rv		ggataacgggaaaagcattg
PrimerRB269fw	Amplifizierung von <i>ilvk</i> für die Bestimmung der PCN	gtcatcgcaacagagcctta
PrimerRB270rv		gcacgaacaaattcgctttc
PrimerRB278rv	Amplifizierung von <i>ilvk</i> für pRBBm306	tatca <u>accggt</u> ggagaaacaactatgacaac
PrimerRB279fw		tatcagcatg <u>ccg</u> aaatttattctactcc
Primer für die Konstruktion des Vektors mit konstitutivem Promotor		
PrimerRB216fw	Amplifizierung des Promotors <i>P_{bmd_1326}</i> für pRBBm258	tatcacttaaggaaggcctgtgaagttac
PrimerRB217rv		tatca <u>aactag</u> tcatctaagtcacctcttc
Primer für die Konstruktion des Vektors mit instabilem Testgen (<i>gfp</i>)		
PrimerSW59fw	Amplifizierung des instabilen <i>gfp-LVA</i> für pSWBm21	atca <u>agatct</u> atgagtaaaggagaagaac
PrimerSW60rv		atc <u>agggccg</u> ttaagctactaaagcgtag
Primer für die Konstruktion von Vektoren für die rekombinante Proteinproduktion und Antikörpergenerierung		
PrimerRB128fw	Amplifizierung von <i>xyIR_{B.meg}</i> für pRBEc2	tatcaggatc <u>ctgt</u> tattattcaaattgcag
PrimerRB129rv		tatcaggatc <u>cccta</u> acttataggggtaacac
PrimerSW01fw	Amplifizierung von <i>xyIT_{B.meg}</i> für pSWEc9	atc <u>accatg</u> gatgaaacaaaatcgaaactc
PrimerSW02rv		atcagcggc <u>cgct</u> atggccttctactcttg
PrimerSW22fw	Amplifizierung von <i>hemC_{B.meg}</i> für pSWEc10	atcaggatc <u>ctcg</u> aaaaattattgtcggctctcg
PrimerSW24rv		atcaggatc <u>cttatt</u> gtccagctcctctttac
Primer für die Amplifizierung der Repressor-Bindestelle für EMSA und Footprint-Analysen		
PrimerSW11fw	Amplifizierung der <i>xyIR</i> -Binde- stelle und DNA-Negativkontrolle für EMSA	tcctttgtttatccaccgaactaag
PrimerSW12rv		cgcctactacttcttcagggttatag
PrimerSW13fw		gggaaatgacaaatggtccaaactagtag
PrimerSW46fw		tttgaagcttgaattag
PrimerSW47rv		caactatcttaattgag
PrimerSW61fw	Amplifizierung der intergenischen Region von <i>xyIR</i> und <i>xyIA</i> für Footprint-Analysen	tcctttgtttatccaccg
PrimerSWDIG-61fw		DIG-tcctttgtttatccaccg
PrimerSW62rv		tgtagattcacctccttg
PrimerSWDIG-62rv		DIG-tgtagattcacctccttg

3.5.7 Reinigung von PCR-Amplifikaten

Für die Reinigung von PCR-Amplifikaten wurde das PCR Purification Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers. Abweichend wurden 32 µL 70 °C heißes, steriles H₂O_{deion.} statt 1 min für 10 min bei RT auf der Säule inkubiert und anschließend eluiert.

3.5.8 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs in den entsprechenden Restriktionspuffern und bei den angegebenen Temperaturen. Die Inkubation erfolgte jeweils für minimal 0,5 h und maximal ü.N..

3.5.9 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld proportional zum negativen Logarithmus ihres relativen Molekulargewichtes aufgetrennt. Zur analytischen Trennung von DNA-Fragmenten wurden 0,7-1,7 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V für 45 – 60 min in 1 x TAE-Puffer. Als Größenvergleich diente der GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas). Für die Detektion der DNA wurde das Agarosegel anschließend für ca. 20 min in Ethidiumbromidlösung gefärbt und unter UV-Belichtung (312 nm) mit einer Videokamera (DeVision G, Decon Science Tec) fotografiert.

1 x TAE-Puffer

TRIS	40 mM
EDTA	1 mM
• pH mit Essigsäure auf 8,0 einstellen	

Probenpuffer

Bromphenolblau	350 µM
Xylen Cyanol FF	450 µM
Glycerin	60 % (v/v)

Ethidiumbromidlösung

Ethidiumbromid in H ₂ O _{deion.}	0,1 % (w/v)
--	-------------

GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Der Marker enthielt die folgenden Fragmente (in Basenpaaren):

10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 und 100.

3.5.10 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von DNA-Fragmenten nach einem Restriktionsverdau zum Entfernen der ab- oder ausgeschnittenen DNA-Stücke erfolgte elektrophoretisch in einem mit dem Farbstoff Gelstar® Nucleic Acid Gel Stain (Lonza) nach dem Lauf gefärbten Agarosegel. Dafür wurden 5 µl Gelstar® Nucleic Acid Gel Stain mit 35 mL 1 x TAE in einer Petrischale gemischt und das Gel für 40 min im Dunkeln inkubiert. Das entsprechende DNA-Fragment wurde auf einem Blauschirm durch einen gelben Filter sichtbar gemacht und aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach dem angegebenen Protokoll gereinigt. Abweichend wurden 32 µL 70 °C heißes, steriles H₂O_{deion.} statt 1 min für 10 min bei RT auf der Säule inkubiert und anschließend eluiert.

3.5.11 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Doppelsträngen mit kohäsiven Enden wurde mittels T4-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro 10 µL Ansatz wurden 50 – 100 ng Vektor-DNA eingesetzt, wobei das Mengenverhältnis von Insert zu Vektor, zwischen 3:1 und 7:1 variierte. Der Reaktionsansatz wurde bei 25 °C für mindestens 2 h oder ü.N. bei 17 °C inkubiert.

3.5.12 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der DNA-Sequenz wurde eine Sequenzierung der entsprechenden Plasmid-DNA durch die Firma GATC Biotech AG durchgeführt.

Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit den Programmen EditSeq (DNASar, Madsion, USA) und Vector NTI (Invitrogen, Carlsbad, USA). In Tabelle 8 sind die für die Sequenzierung verwendeten Primer angegeben.

Tabelle 8: Verwendete Sequenzierprimer. Die Abkürzungen "fw" (vorwärts) und "rv" (rückwärts) beschreiben die Orientierung des Primers in der Sequenzierreaktion.

Vektoren	Sequenzierprimer	Primersequenz (5'-3')
pSWBm21	seqP _{xyIA} _fw	aagttggtgttttgaagc
	seqMM1520_rev	gtttgcgcattcacagttctcc
pSWBm14 pSWBm16 pSWBm17	seqPrimerSW42fw	aaattgaatccattg
	seqPrimerSW43rv	cctataagttagttaag
	seqPrimerSW44rv	tatctaagcctacaatggc
	seqPrimerSW45fw	aaggtgtgcctaagaaag
	seqPrimerSW52fw	ttctgtattcttaaataagttgg
pSWEc09	T7@gatc	taatacgactcactataggg
pSWEc10	T7@gatc	taatacgactcactataggg

3.5.13 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) ist eine Methode zur Bestimmung der Plasmidkopienzahl (PCN). Die Plasmidkopienzahl ist definiert als Anzahl von Plasmiden pro Zelle bzw. Chromosom. Es handelt es sich hierbei um eine schnelle, sehr sensitive und kostengünstige Methode (Lee *et al.*, 2006). Die Bestimmung der Plasmidkopienzahl erfolgte in dieser Arbeit mit *B. megaterium* DSM319 transformiert mit pSSBm85, DSM319 transformiert mit pSWBm09, DSM319 transformiert mit pSWBm14, DSM319 transformiert mit pSWBm16 und DSM319 transformiert mit pSWBm17.

Für die Bestimmung der PCN werden Markergene benötigt, die auf dem Plasmid bzw. Chromosom nur einmal vorkommen. Dafür wurden zwei separate Primerpaare benötigt, eines für die Amplifizierung des Plasmid-Markergens, *gfp*, und das andere für die Amplifizierung des chromosomalen Markergens, *ilvK*, die mit Hilfe der Software Primer3 (<http://biotools.umassmed.edu>) konstruiert wurden (Tabelle 7). Die Primer wurden so gewählt, dass PCR-Amplifikate mit je einer Länge von 140 bp entstehen, was bedeutet, dass die Konzentrationen nicht in Kopienzahlen umgerechnet werden mussten, da Konzentrationen und Kopienzahlen in einem proportionalen Verhältnis zueinanderstehen (Lee *et al.*, 2006). Die Chromosomal-codierende Sequenz sollte sich außerdem gegenüber des *oris* befinden, was

gewährleistet, dass erst ein vollständig repliziertes Chromosom detektiert wurde. Nach der Bestimmung der Markergene und Primerwahl erfolgte die Erstellung der Standardkurve und die Ermittlung der Effizienz der PCR-Reaktionen sowie die Durchführung der qRT-PCR zur Bestimmung der PCN der entsprechenden Plasmide.

Tabelle 9: Spezifikationen für die Primerauswahl über Primer3-Software.

Primerspezifikationen	
Länge	140-opt. 140-160
Primer T_m	58-62 °C
Primer GC%	45-55
Max Self Compl.	4
Max 3' Compl.	3

Erstellung der Standardkurve und Ermittlung der Effizienz

Für die in dieser Arbeit verwendete absolute Quantifizierung der PCN wurden zunächst Standardkurven erstellt. Dafür wurde ein Kalibrator (Plasmid) konstruiert, der sowohl das Plasmid- als auch das Chromosom-Markergen enthält (pRBBm309). Dabei handelte es sich um *gfp* (Plasmid-Markergen) und *ilvk* (Chromosom-Markergen). Aus dieser Plasmid-DNA wurden fünf Verdünnungen im Bereich von 0,001 ng/µL bis 10 ng/µL hergestellt, die als Template für die qRT-PCR diente. Aus den C_T -Werten der einzelnen Verdünnungen (Triplikate) wurden Mittelwerte gebildet und gegen den Logarithmus der fünf eingesetzten Konzentrationen aufgetragen, so dass für jedes Markergen eine Standardkurve ermittelt wurde. Mit Hilfe der Standardkurven kann von gegebenen C_T -Werten der zu untersuchenden Proben auf die DNA-Konzentration geschlossen werden. Der C_T -Wert („*cycle threshold*“) ist eine theoretische Größe, die den Anfang des exponentiellen Wachstums einer Kurve nach Fluoreszenzmessung beschreibt. Je mehr DNA vor der PCR im Reaktionsansatz vorlag, desto mehr Kopien entstehen während der PCR-Zyklen und umso schneller kommt es zu exponentiell verlaufenden Fluoreszenzsignalen. Um die C_T -Werte mehrerer Proben vergleichen zu können, muss die PCR-Reaktion mit der gleichen Effizienz erfolgen (Kück, 2005). Die Effizienz lässt sich aus den Standardkurven ermitteln. Eine hohe Effizienz der PCR-Reaktion zeigt sich in parallel verlaufenden Standardkurven der Markergene wieder. In Tabelle 10 ist das Pipettierschema und das Temperaturprogramm für die qRT-PCR dargestellt.

Tabelle 10: Pipettierschema und Temperaturprogramm für die quantitative Real-Time-PCR.

Pipettierschema für quantitative Real-Time-PCR		
SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Biorad)	10	µL
DNA-Template (0,001 – 10 ng/µL)	2	µL
Primer fw (<i>gfp</i> : RB267fw, <i>ilvk</i> : RB269fw)	2	µL
Primer rv (<i>gfp</i> : RB268rv, <i>ilvk</i> : RB270rv)	2	µL
dH ₂ O	4	µL
Temperaturprogramm für quantitative Real-Time-PCR		
Temperatur	Zeit	Funktion
94 °C	60 s	Denaturierung der DNA
94 °C	30 s	Denaturierung amplifizierter dsDNA
55 °C	5 s	Anlagerung der Primer & Elongation (39 Wiederholungen)
65 °C - 95 °C	5 s/ 0,5 °C	Schmelzkurve

Isolierung der genomischen und Plasmid-DNA aus *B. megaterium*-Plasmid-Stämmen

Zur Bestimmung der Plasmidkopienzahl (PCN) aus *B. megaterium* DSM319 transformiert mit pSSBm85, DSM319 transformiert mit pSWBm09, DSM319 transformiert mit pSWBm14, DSM319 transformiert mit pSWBm16, DSM319 transformiert mit pSWBm17 und DSM319 transformiert mit pRBBm309 (für Standardkurve) wurde aus jedem Stamm genomische und Plasmid-DNA isoliert. Hierfür wurde jeweils eine 50 mL LB-Vorkultur mit entsprechenden Antibiotikazusätzen im 300 mL-Schikanekolben mit Kolonien inokuliert und ü.N. bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die 100 mL Hauptkultur im 500 mL-Schikanekolben 1:100 inokuliert und bis zu einer OD_{578 nm} von 0,3 bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Kulturen wurden mit 0,5 % (w/v) Xylose induziert und 3 h weiter inkubiert. Danach wurde 1 mL Kultur entnommen, 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die Isolation der DNA wurde das QIAamp® DNA Mini Kit von Qiagen nach Herstellprotokoll verwendet. Abweichend wurde die DNA in 200 µL 70 °C heißem dH₂O für 10 min bei RT gelöst und eluiert. Der Elutionsschritt wurde weitere zweimal wiederholt, so dass Konzentrationen von 200 ng/µL - 500 ng/µL DNA erreicht wurden.

Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) im Thermal Cycler und Berechnung der PCN

Die qRT-PCR zur Bestimmung der PCN und zur Erstellung der Standardkurve wurde im CFX96™ Real-Time System/C1000™ Thermal Cycler von Biorad durchgeführt. Dabei wurden für jede Messung Triplikate erstellt. Für die Bestimmung der PCN der

Plasmide wurde 4 ng Template-DNA eingesetzt und für die Erstellung der Standardkurve fünf Verdünnungen im Bereich von 0,002 ng bis 20 ng. Als Mastermix wurde der SsoFast™ EvaGreen® Supermix von Biorad eingesetzt. Das Pipettierschema und das Temperaturprogramm für die qRT-PCR sind in Tabelle 10 dargestellt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Biorad CFX Manager. Mit Hilfe dieses Programms wurden für jede Messung C_T-Werte erhalten, über die die Konzentrationen der Markergene anhand der vorher erstellten Standardkurven ermittelt wurden. Zur Bestimmung der PCN wurde die Konzentration von *gfp* durch die Konzentration von *ilvK* dividiert.

3.6 Rekombinante Proteinproduktion und dessen Analyse in *Bacillus megaterium*

3.6.1 Expression rekombinanter Gene in *Bacillus megaterium*

Für die rekombinante Proteinproduktion wurden die jeweiligen *B. megaterium*-Stämme mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Ausgehend von Plattenkulturen dieser Plasmidstämme wurden Vorkulturen in 50 mL LB- oder A5+4-Medium mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen inokuliert und ü.N. schüttelnd (100 rpm) bei 37 °C inkubiert. Ausgehend von diesen Vorkulturen wurden 100 mL LB- oder A5+4-Medium in 500 mL Schikanekolben im Verhältnis 1:100 angeimpft und schüttelnd (220 rpm) bei 37 °C inkubiert. Die Induktion der rekombinanten Genexpression erfolgte nach Erreichen einer OD_{578 nm} von 0,3 – 0,4 durch Zugabe von 0,5 % (w/v) Xylose.

3.6.2 Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht das Zählen und die Analyse einer bestimmten Anzahl an Partikeln wie z.B. Bakterienzellen. Mit Hilfe von Gfp-produzierenden Bakterien können bestimmte Eigenschaften einer Zellpopulation auf Einzelzellebene analysiert werden. Bei dieser Methode werden die fluoreszierenden Zellen in einem Mikrokanal nacheinander mit einem Laserstrahl (488 nm) angeregt. Das dabei emittierte Licht wird von einem Detektor (FL1) erfasst. Dadurch erhält man quantitative Informationen über jede einzelne analysierte Zelle innerhalb weniger Minuten. Zusätzlich zu den Fluoreszenzsignalen wird auch das Streulicht der zu untersuchenden Zellen mittels Detektor detektiert. Das Vorwärtsstreulicht (FSC =

„forward scatter“) korreliert mit der Größe einer Zelle, das Seitwärtsstreulicht (SSC = „side scatter“) mit der Granularität.

Für die Fluoreszenz-Durchflussszytometrie wurde das Durchflussszytomter CyFlow®Cube8 der Firma Partec verwendet. Für die Messungen wurden 50 mL A5+4-Medium mit den entsprechenden Antibiotika-Zusätzen von einer Plattenkultur inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Ausgehend von diesen Vorkulturen wurden 100 mL Hauptkulturen 1:100 angeimpft und bei 220 rpm und 37 °C bis zu einer OD_{578 nm} von 0,3 inkubiert. Aus diesen Hauptkulturen wurden pro Stamm 2 mL A5+4-Medium auf eine OD_{578 nm} von 0,005 eingestellt und direkt vermessen (Probe vor Induktion). Die Kulturen wurden mit 0,5 % (w/v) Xylose induziert und weiter bei 220 rpm und 37 °C inkubiert. Zwei, vier, sechs und acht Stunden nach Induktion sowie ü.N. erfolgte die Probennahme. Dabei wurden erneut 2 mL A5+4-Medium auf eine OD_{578 nm} von 0,005 eingestellt und direkt am Durchflussszytometer vermessen. In jeder Messung wurden 10.000 Partikel im Messmodus „cells in region“ analysiert. Die Empfindlichkeit der Detektoren („gain“) wurde anhand eines nicht-fluoreszierenden Stammes zu Beginn der Messungen im Modus „analyze all“ ermittelt. Die Einstellungen eines Schwellenwerts („threshold“) des Vorwärtsstreulichts (FSC) ermöglicht es, dass Partikel, die kleiner sind als die zu untersuchenden Zellen, von der Detektion ausgeschlossen werden. Kleinere Zelltrümmer und Hintergrundrauschen des Mediums werden somit nicht bei der Messung erfasst. Um diesen Schwellenwert zu bestimmen, wurde ebenfalls im Modus „analyze all“ steriles A5+4-Medium vermessen. Die Einstellung für den „threshold“ und den „gain“ sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: Einstellung am Durchflussszytometer für *B. megaterium* und *B. subtilis*.

		<i>B. megaterium</i>	<i>B. subtilis</i>
gain	FSC	151,0 V	151,0 V
	SSC	251,0 V	251,0 V
	FL1	321,0 V	321,0 V
threshold	FSC	0,004 V	0,0009 V

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in einem Histogramm durch die Software FlowJo (Version 10). Dieses Programm ermöglicht die Erfassung des prozentualen

Anteils an fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zellen einer Zellpopulation. Der prozentuale Anteil wurde hierbei durch die Bestimmung der Flächen des entsprechenden Peaks im Histogramm ermittelt.

3.6.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine erweiterte Form der Lichtmikroskopie, bei der fluoreszierende Objekte sichtbar gemacht werden können. Die entsprechenden Objekte werden mit Licht einer bestimmten Wellenlänge mittels Filter angeregt und beginnen zu fluoreszieren. Das fluoreszierende Licht wird durch einen Detektor erfasst und somit als leuchtendes Objekt unter dem Mikroskop sichtbar.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden 10 µL Probe aus den entsprechenden *B. megaterium*-Kulturen entnommen. Für die Immobilisierung der Zellen wurden diese Proben und 4 µL 3 %ige Low-Melt-Agarose in 1 x PBS auf einem Objektträger gemischt und mit einem Deckgläschen bedeckt. Nach dem Aushärten der Agarose wurden die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen am Axiovert 200M Mikroskop (Carl Zeiss, Deutschland) aufgenommen. Die Aufnahmen wurden unter Verwendung des Filter Sets 38 für Gfp (Zeiss) mit 630-facher Vergrößerung gemacht. Die aufgenommenen Bilder konnten mit dem Programm AxioVision Rel. 4.8 ausgewertet werden.

3.6.4 Fluoreszenz-Time lapse-Mikroskopie

Unter Time lapse versteht man die Aufnahme von mikroskopischen Bildern, die nacheinander und in sehr kurzen Zeitabständen über einen längeren Zeitraum erfolgen. Danach werden die aufgenommenen Bilder nacheinander und in einer beliebigen Geschwindigkeit abgespielt, so dass sie folglich einen Film ergeben. Diese Methode ermöglicht Zellprozesse, wie zum Beispiel die Zellteilung von Bakterien, detailliert und beschleunigt darzustellen. Für die Time lapse-Aufnahmen wurde eine 100 mL A5+4-Hauptkultur von DSM319 transformiert mit pSSBm85 bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD_{578 nm} von 0,3 wachsen gelassen. Ausgehend davon wurde 1 µL Hauptkultur auf ein kleines A5+4-Agar-Pad mit 0,5 % (w/v) Xylose pipettiert und in eine flache 35-mm Micro-Petrischale (Ibidi, Martinsried) überführt (Young *et al.*, 2012). Für das Agar-Pad wurde 1 mL warmer A5+4-Agar mit 0,5 % Xylose auf ein Deckgläschen pipettiert und kurz vor dem Aushärten mit einem

zweiten Deckgläschen überdeckt und leicht angedrückt. Das Agar-Pad wurde von den Deckgläschen befreit und nach Bedarf zurechtgeschnitten. Die Petrischale wurde im zugehörigen Mikroskop-Inkubator auf 37 °C gewärmt. Die Aufnahmen erfolgten am Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop in fünfminütigen Abständen für 6 h. Die Aufnahmen wurden unter Verwendung des Filter-Sets 38 für Gfp (Zeiss) mit 630-facher Vergrößerung gemacht und die Auswertung der Bilder erfolgte mit dem Programm Axiovision 4.8 (Zeiss).

3.6.5 Kultivierung im Mikrobioreaktorsystem

Der BioLector (m2p-Labs, Aachen) ist ein Bioreaktorsystem, welches die Kultivierung und Analyse von Flüssigkulturen im 48-Wellplatten-Format mit maximal 1 mL Kulturvolumen ermöglicht. Dabei kommen sogenannte Flowerplates zum Einsatz, die eine bessere Versorgung der Zellen mit Sauerstoff durch Schikanen gewährleisten. Das System erlaubt die Online-Messung verschiedener Parameter über den gesamten Wachstumsverlauf ohne Unterbrechung der Kultivierung. In Abhängigkeit der zu untersuchenden und gewählten Parameter kann die Messung im Minutentakt erfolgen, wobei die Dauer der Messung pro Parameter berücksichtigt werden muss (3 min/Parameter). Die 48-Wellplatte verfügt über einen transparenten Boden, der die Messung von unten und unter kontinuierlichem Schütteln ermöglicht. Mit dem System kann unter anderem die Quantifizierung von Biomasse mittels Streulicht (620 nm), die Detektion von Fluoreszenz (z. B. Gfp bei 486 nm, mCherry bei 589 nm), der pH-Wert und die gelöste Sauerstoffkonzentration über Optodentechnik und intrazellulären Metaboliten wie NADH (365 nm) bestimmt werden. Zusätzlich können die Schüttelgeschwindigkeit, die Temperatur und die Luftfeuchtigkeit im BioLector reguliert werden.

Für die Kultivierung im BioLector wurden 50 mL A5+4-Medium mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen in 300 mL-Schikanekolben mit Kolonien der entsprechenden Plattenkultur inokuliert. Die Vorkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Ausgehend von diesen Vorkulturen wurden pro Kultur 10 mL A5+4-Medium auf eine OD_{578 nm} von 0,055 eingestellt. Aus diesen 10 mL-Kulturen wurden pro Stamm drei Wells der 48-Wellplatte (FlowerPlate®, MTP-48-B, m2p-Labs) mit 1 mL Kultur befüllt. Die Inkubation der Kulturen im BioLector erfolgte bei 37 °C und 1400 rpm.

3.7 Rekombinante Proteinproduktion in *Escherichia coli* und Analysen der rekombinanten Proteine

3.7.1 Rekombinante Produktion von His-XylR_{B.meg} in *Escherichia coli* und Affinitätschromatographische Reinigung

Für die rekombinante Proteinproduktion von His-XylR_{B.meg} wurden *E. coli* BL21(DE3) pLysS Star-Zellen mit dem Plasmid pRBec2 (His-XylR_{B.meg}) transformiert. Ausgehend davon wurden Vorkulturen von 50 mL LB- oder M9-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin sowie 34 µg/mL Chloramphenicol angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden zwölfmal 500 mL des entsprechenden Mediums in 1 L Schikanekolben im Verhältnis 1:100 inokuliert und schüttelnd (220 rpm) bei 37 °C kultiviert. Die Induktion der rekombinanten Genexpression erfolgte bei einer OD_{578 nm} von 2 durch Zugabe von 400 µM IPTG. Für die rekombinante Proteinproduktion von His-XylR_{B.meg} mit gebundener Xylose erfolgte zusätzlich die Zugabe von 0,5 % (w/v) Xylose während der Induktion. Die Inkubation erfolgte ü.N. bei 37 °C und 220 rpm.

Die Zellernte der Kulturen zur Proteinproduktion von His-XylR_{B.meg} erfolgte mittels Zentrifugation in 1 L-Zentrifugenflaschen (3000 x g, 20 min, 4 °C). Das Zellsediment aus der Produktion mit zugefügter Xylose wurde in 4 mL Resuspensionspuffer mit Xylose (pro 1 L Kultur), das Zellsediment aus der Produktion ohne zugefügter Xylose in 3 mL Resuspensionspuffer ohne Xylose (pro 1 L Kultur) resuspendiert. Die resuspendierten Zellen aus 3 L Kultur wurde vereint, in 50 mL Falkons überführt und bei -20 °C eingefroren. Für die weitere Behandlung wurde das resuspendierte Sediment auf Eis aufgetaut und mit 7 mM Imidazol sowie 0,5 µl Benzonase (Merck Millipore, 250 U/µl) versetzt. Der Aufschluss der 12 bzw. 9 mL-Resuspension erfolgte mittels Ultraschallhomogenisator (3 x 5 min, 2 min Pause zwischen jeder Ultraschallbehandlung, 50 % cycle, 70 % power, Sonotrode MS72). Das Zelllysate wurde in 2 mL Eppendorfgefäßen bei 18000 x g und 4 °C für 60 min zentrifugiert. Der erhaltene zellfreie Extrakt wurde für die Reinigung eingesetzt.

Zur Reinigung des rekombinanten His-XylR_{B.meg} über den N-terminalen His-Tag diente eine Affinitätschromatographie mit Chelating-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) als Säulenmaterial. Das Säulenmaterial (4 mL) wurde zu Beginn mit 5 SV H₂O gewaschen und anschließend für 10 min mit 2 SV Nickelsulfatlösung (100 mM) beladen. Danach wurde die Säule mit 5 SV H₂O gewaschen und mit 5 SV Puffer mit Xylose (für die Reinigung von His-XylR_{B.meg} mit gebundener Xylose) oder

ohne Xylose (für die Reinigung von His-XylR_{B.meg} ohne gebundene Xylose) äquilibriert. Anschließend wurde der zellfreie Überstand auf die Säule gegeben und im Anschluss mit 18 SV Waschpuffer I (mit/ohne Xylose) sowie 12 SV Waschpuffer II (mit/ohne Xylose) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 2 SV Elutionspuffer (mit/ohne Xylose), wobei 6 Fraktionen zu jeweils 1 mL aufgefangen wurden. 15 µL jeder Fraktion (Durchlauf, Waschfraktion I, Waschfraktion II und Elutionsfraktionen 1-6) wurden mit 5 µL SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min erhitzt. Die Proben dieser Fraktionen wurden auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen und analysiert.

Die Regeneration der Säule erfolgte mit 2 SV Regenerationspuffer, um die Nickelionen zu entfernen, und anschließend mit 2 SV 6 M Guanidiniumhypochloridlösung, um eventuell zurückgebliebene Proteine zu denaturieren. Danach wurde die Säule mit 10 SV H₂O gewaschen und in 20 % EtOH bei 4 °C gelagert.

Resuspensionspuffer (mit/ohne Xylose)

HEPES, pH 7,4	40,0	mM
NaCl	400,0	mM
Glycerol	10,0	% (v/v)
(Xylose	0,5	% (w/v))

Waschpuffer I (mit/ohne Xylose)

HEPES, pH 7,4	40,0	mM
NaCl	400,0	mM
Glycerol	10,0	% (v/v)
(Xylose	0,5	% (w/v))
Imidazol	50,0	mM

Waschpuffer II (mit/ohne Xylose)

HEPES, pH 7,4	40,0	mM
NaCl	400,0	mM
Glycerol	10,0	% (v/v)
(Xylose	0,5	% (w/v))
Imidazol	100,0	mM

Elutionspuffer (mit/ohne Xylose)

HEPES, pH 7,4	40,0	mM
NaCl	400,0	mM
Glycerol	10,0	% (v/v)
(Xylose	0,5	% (w/v))
Imidazol	400,0	mM

Regenerationspuffer

Tris-HCl, pH 8,0	20	mM
EDTA	50	mM
NaCl	500	mM

3.7.2 Rekombinante Produktion von Strep-XylR_{B.meg} in *Escherichia coli* und Affinitätschromatographische Reinigung

Für die rekombinante Proteinproduktion von Strep-XylR_{B.meg} wurden *E. coli* BL21(DE3) pLysS Star-Zellen mit dem Plasmid pSWEc8 (Strep-XylR_{B.meg}) transformiert. Ausgehend davon wurden Vorkulturen von 50 mL LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin sowie 34 µg/mL Chloramphenicol angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden zwölfmal 500 mL in 1 L Schikanekolben im Verhältnis 1:100 inokuliert und schüttelnd (220 rpm) bei 37 °C kultiviert. Die Induktion der rekombinanten Genexpression erfolgte bei einer OD_{578 nm} von 2 durch Zugabe von 400 µM IPTG. Die Inkubation erfolgte ü.N. bei 37 °C und 220 rpm.

Die Zellernte der Kulturen zur Proteinproduktion von Strep-XylR_{B.meg} erfolgte mittels Zentrifugation in 1 L-Zentrifugenflaschen (3000 x g, 20 min, 4 °C). Das Zellsediment wurde in 4 mL Waschpuffer (pro 1 L Kultur) resuspendiert. Die resuspendierten Zellen aus 3 L Kultur wurde vereint, in 50 mL Falkons überführt und bei -20 °C eingefroren. Für die weitere Behandlung wurde das resuspendierte Sediment auf Eis aufgetaut und mit 0,5 µl Benzonase (Merck Millipore, 250 U/µl) versetzt. Der Aufschluss der 12 mL-Resuspension erfolgte mittels Ultraschallhomogenisator (3 x 5 min, 2 min Pause zwischen jeder Ultraschallbehandlung, 50 % cycle, 70 % power, Sonotrode MS72). Das Zelllysate wurde in 2 mL Eppendorfgefäßen bei 18000 x g und 4 °C für 60 min zentrifugiert. Der erhaltene zellfreie Extrakt wurde für die Reinigung eingesetzt.

Zur Reinigung des rekombinanten Strep-XylR_{B.meg} über den N-terminalen Strep-Tag diente eine Affinitätschromatographie mit Streptacin Superflow High Capacity als

Säulenmaterial. Das Säulematerial (4 mL) wurde zu Beginn mit 5 SV H₂O gewaschen und danach mit 5 SV Waschpuffer I äquilibriert. Anschließend wurde der zellfreie Überstand auf die Säule gegeben und zweimal mit 6 SV Waschpuffer I gewaschen. Die Elution erfolgte mit 2 SV Elutionspuffer, wobei 6 Fraktionen zu jeweils 1 mL aufgefangen wurden. 15 µL jeder Fraktion (Durchlauf, Waschfraktion I, Waschfraktion II und Elutionsfraktionen 1-6) wurden mit 5 µL SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min erhitzt. Die Proben aller Fraktionen wurden auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen und analysiert.

Die Regeneration der Säule erfolgte mit 2 SV Regenerationspuffer, um das Desthiobiotin zu entfernen, und anschließend mit 4 SV Waschpuffer II, pH 10,5 sowie 4 SV Waschpuffer III, pH 7,4. Danach wurde die Säule in 20 % EtOH bei 4 °C gelagert.

Waschpuffer I

Natrium-Phosphat Puffer, pH 7,0	100	mM
NaCl	500	mM

Waschpuffer II

Natrium-Phosphat Puffer, pH 10,5	100	mM
NaCl	500	mM

Waschpuffer III

Natrium-Phosphat Puffer, pH 7,4	100	mM
NaCl	500	mM

Elutionspuffer

Natrium-Phosphat Puffer, pH 7,0	100,0	mM
NaCl	500,0	mM
Desthiobiotin	2,5	mM

Regenerationspuffer

HABA (2-[4'-Hydroxy-Benzeneazo]Benzoessäure)	10	% (v/v)
Natrium-Phosphat Puffer, pH 7,0	100	mM
NaCl	500	mM

3.7.3 Rekombinante Produktion von XylT_{B.meg} in *Escherichia coli* und Präparation der Gesamtzellproteine

Für die rekombinante Proteinproduktion von XylT_{B.meg}-His wurden *E. coli* C43(DE3)-Zellen mit dem Plasmid pSWEc9 (XylT_{B.meg}-His) transformiert. Ausgehend von dieser Platte wurden Vorkulturen von 50 mL LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden 100 mL Kulturen in 500 mL Schikanekolben im Verhältnis 1:100 inokuliert und schüttelnd (220 rpm) bei 17 °C kultiviert. Die Induktion der Genexpression erfolgte bei einer OD_{578 nm} von 0,3 – 0,4 durch Zusatz von 400 µM IPTG. Die Inkubation erfolgte bis 5 h nach Induktion.

Während der Inkubation wurde der Kultur stündlich 1 OD-Äquivalente entnommen, die Zellen sedimentiert (18000 × g, 4 °C, 2 min) und das Zellsediment mit 100 µL SDS-Probenpuffer (siehe 3.7.4) versetzt. Daraus wurden 20 µL (2x10⁸ Zellen) auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Gesamtzellproteine mittels Westernblot analysiert.

3.7.4 Proteinanalyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Methode der diskontinuierlichen SDS-PAGE unter Fokussierung der Proteine in einem großporigen Sammelgel und anschließender Auftrennung in einem kleinporigen Trenngel wurde nach dem Protokoll von Lämmli (1970) mit den Modifikationen von Righetti *et al.* (1990) durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Es wurden 12 %ige Polyacrylamidgele zur Auftrennung verwendet. Zur Abschätzung der relativen Molekülmassen wurde ein entsprechender Marker verwendet (Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)). Die Elektrophorese wurde bei einem Stromfluss von 6 mA/cm² durchgeführt, was einer Stromstärke von 45 mA pro Gel entspricht. Der Lauf wurde beendet, sobald das Bromphenolblau das Ende des Gels erreicht hatte. Für die Färbung der Proteine wurde das SDS-Gel in Färbelösung überführt, in der Mikrowelle aufgekocht und weiter für 15 min bei RT in der Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden die Gele bis zur völligen Entfärbung der proteinfreien Gelmatrix in Entfärbelösung inkubiert. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden die Gele eingescannt und zur Konservierung zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet.

Acrylamid-Stammlösung

Acrylamid	30 % (w/v)
N,N'-Methylenbisacrylamid	1 % (w/v)

Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung

APS	10 % (w/v)
-----	------------

Trenngel [12%ig (w/v)]

H ₂ O _{deion.}	7 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4 % (w/v) SDS	5 mL
Acrylamid-Stammlösung	8 mL
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	20 µL
APS-Lösung	200 µL

Sammelgel [6%ig (w/v)]

H ₂ O _{deion.}	5,5 mL
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS	2,5 mL
Acrylamid-Stammlösung	2,0 mL
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	10,0 µL
APS-Lösung	100,0 µL

SDS-Probenpuffer

Glycerin	40 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	2 mM
SDS	110 mM
Bromphenolblau	3 mM
Tris-HCl, pH 6,8	100 mM

Färbelösung

Essigsäure	10 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue G-250	1 g/L

Entfärbelösung

Ethanol	30 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

Unstained Protein Molecular Weight Marker

(angegeben ist jeweils das Molekulargewicht [Da]) 116000, 66200, 45000, 35000, 25000, 18400 und 14400.

10 x Laufpuffer

Tris-Base	250 mM
Glycin	2 M
SDS	1 % (w/v)

3.7.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BSA-Standardreihe

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch einen visuellen Vergleich mit einer BSA-Standardreihe. Dazu wurden 2 μ L BSA-Lösung (Albumin Fraktion V, Roth) mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1; 0,4; 0,7; 1,0; 1,3; 1,7 und 2,0 mg/mL) auf ein SDS-Gel aufgetragen. Zusätzlich wurden unterschiedliche Volumina (1, 2 und 4 μ L) des zu analysierenden, gereinigten Proteins auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte nach Kapitel 3.7.4.

3.7.6 Western-Blot-Analyse

Proteine, die in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden, können zur weiteren Analyse mittels Elektrottransfer im „Semidry-Blot“-Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Transfermembran (Roti®; 0,45 μ m Porengröße) übertragen werden. Auf dieser werden die Proteine durch polare Wechselwirkungen immobilisiert und können so durch einen Antikörper, der an ein Enzym gekoppelt ist, spezifisch nachgewiesen werden.

Für die Anfertigung eines Western-Blots wurden die SDS-PAGE-Gele direkt nach der Gelelektrophorese in Towbinpuffer äquilibriert und die Proteine anschließend 15 min bei 15 V pro Gel im „Semidry-Blot“ auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei RT in Blocking-Lösung inkubiert. Das darin enthaltene Milchpulver sättigt freie Bindungsstellen der Membran ab. Es erfolgte die Inkubation des primären Anti-His-Antikörpers (aus Maus, 1:5000 verdünnt, Sigma) für 1 h bei RT in Blocking-Lösung. Danach wurde die Membran dreimal für 10 min in Waschlösung gewaschen und im Anschluss für 45 min mit dem sekundären Anti-Maus-Antikörper (gekoppelt an alkalische Phosphatase, 1:5000 verdünnt, Sigma) inkubiert. Anschließend erfolgte ein viermaliges Waschen mit 1 x PBS-Tween20 für je 10 min bei RT und eine Inkubation für 10 min im alkalischen Phosphatase-Puffer (alkaline phosphatase buffer, APB). Es folgte die Zugabe der Färbelösung. Die an den Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase (AP) katalysiert die Farbreaktion von 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) mit Nitroblau-Tetrazolium (NBT), wobei sich ein blaues Präzipitat auf der Membran bildet. Durch Waschen mit H₂O kann diese Reaktion gestoppt werden. Zur Dokumentation und Archivierung wurde die Membran eingescannt, getrocknet und lichtgeschützt verpackt.

Towbinpuffer

Tris-HCl, pH 8,5	25	mM
Glycin	150	mM

10 x PBS-Puffer

NaCl	1,37	M
KCl	27,00	mM
Na ₂ HPO ₄	100,00	mM
KH ₂ PO ₄	20,00	mM

1 x PBS-Tween20

10 x PBS	10,0	% (v/v)
Tween20	0,1	% (v/v)

Blocking-Lösung

Milchpulver	5,0	% (w/v)
• in 1 x PBS-Tween20		

Waschlösung

Milchpulver	0,5	% (w/v)
• in 1 x PBS-Tween20		

Alkalische Phosphatase-Puffer (APB)

Tris-HCl, pH 9,5	100	mM
NaCl	100	mM
MgCl ₂	5	mM

Färbelösung

APB	20	mL
NBT-Lösung (50 mg/mL in 70 % (v/v) DMSO)	132	µL
BCIP-Lösung (50 mg/mL in DMF)	33	µL

3.7.7 Analyse von geeigneten Pufferbedingungen für His-XylR_{B.meg} über Thermofluor-Analysen

Der Thermofluor-Assay ist eine Methode zur Bestimmung der optimalen Pufferbedingungen für ein Protein, um das gereinigte Protein optimal zu stabilisieren. Das Prinzip beruht auf der Messung der Schmelztemperatur des Proteins. Dabei wird das Protein in einem Thermocycler (qRT-PCR Maschine, CFX96, Bio-Rad, USA) erhitzt und beginnt zu denaturieren. Durch die Denaturierung werden hydrophobe Reste frei gelegt, so dass sich der Farbstoff SYPRO_{TM} Orange anlagern kann. Sobald der Farbstoff am denaturierten Protein bindet, ist er in der Lage zu

fluoreszieren. Über die steigende Fluoreszenz bei steigender Temperatur kann die Schmelztemperatur des Proteins in den getesteten Puffern bestimmt werden. Der Thermofluor-Assay besteht aus dem „SYPRO™ Orange-Konzentrationstest“, dem „Puffertest“ und dem „Additiventest“, die nacheinander durchgeführt werden.

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration von SYPRO™ Orange wurden 40 µL Elutionspuffer (100 mM Natrium-Phosphat, 500 mM NaCl, 400 mM Imidazol), 5 µL Elutionsfraktion mit His-XylR_{B.meg} (0,5 mg/mL, in LB-Medium produziert) und 5 µL 100 x, 50 x oder 10 x SYPRO™ Orange in eine transparente 96-Wellplatte (Microseal®, Bio-Rad, USA) pipettiert. Die 96-Wellplatte wurde im Thermocycler von 10 °C auf 90 °C in 0,5 °C Schritten erhitzt. Die verschiedenen Temperaturen wurden für 15 s gehalten, wobei die Messung der Fluoreszenz stattfand. Mit der Software CFX Manager (Bio-Rad, USA) konnten analysiert werden, welche Fluoreszenzfarbstoffkonzentration die besten Signale lieferte. Mit der ermittelten optimalen Farbstoffkonzentration wurde im Anschluss der „Puffertest“ durchgeführt. Hierfür wurden 5 µL SYPRO™ Orange in der vorher ermittelten Konzentration (50 x) und 5 µL Elutionsfraktion mit His-XylR_{B.meg} (0,5 mg/mL) mit 40 µL des jeweils zu testenden Puffers gemischt.

Tabelle 12: Eingesetzte Pufferbedingungen im Thermofluor-Assay.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	40mM Acetat pH 4,0	40mM Acetat pH 4,4	40mM Citrat pH 5,0	40mM Citrat pH 5,4	40mM MES pH 6,0	40mM MES pH 6,4	40mM HEPES pH 7,0	40mM HEPES pH 7,4	40mM Tris-HCl pH 8,0	40mM Tris-HCl pH 8,4	40mM CHES pH 9,0	40mM CHES pH 9,4
B	40mM Acetat pH 4,0 80mM NaCl	40mM Acetat pH 4,4 80mM NaCl	40mM Citrat pH 5,0 80mM NaCl	40mM Citrat pH 5,4 80mM NaCl	40mM MES pH 6,0 80mM NaCl	40mM MES pH 6,4 80mM NaCl	40mM HEPES pH 7,0 80mM NaCl	40mM HEPES pH 7,4 80mM NaCl	40mM Tris-HCl pH 8,0 80mM NaCl	40mM Tris-HCl pH 8,4 80mM NaCl	40mM CHES pH 9,0 80mM NaCl	40mM CHES pH 9,4 80mM NaCl
C	40mM Acetat pH 4,0 160mM NaCl	40mM Acetat pH 4,4 160mM NaCl	40mM Citrat pH 5,0 160mM NaCl	40mM Citrat pH 5,4 160mM NaCl	40mM MES pH 6,0 160mM NaCl	40mM MES pH 6,4 160mM NaCl	40mM HEPES pH 7,0 160mM NaCl	40mM HEPES pH 7,4 160mM NaCl	40mM Tris-HCl pH 8,0 160mM NaCl	40mM Tris-HCl pH 8,4 160mM NaCl	40mM CHES pH 9,0 160mM NaCl	40mM CHES pH 9,4 160mM NaCl
D	40mM Acetat pH 4,0 400mM NaCl	40mM Acetat pH 4,4 400mM NaCl	40mM Citrat pH 5,0 400mM NaCl	40mM Citrat pH 5,4 400mM NaCl	40mM MES pH 6,0 400mM NaCl	40mM MES pH 6,4 400mM NaCl	40mM HEPES pH 7,0 400mM NaCl	40mM HEPES pH 7,4 400mM NaCl	40mM Tris-HCl pH 8,0 400mM NaCl	40mM Tris-HCl pH 8,4 400mM NaCl	40mM CHES pH 9,0 400mM NaCl	40mM CHES pH 9,4 400mM NaCl

Nach der Bestimmung des optimalen Puffers wurden zusätzlich noch verschiedene Additive („Additiventest“) getestet, um die Stabilität des Proteins weiter zu verbessern. Hierfür wurden erneut 5 µL SYPRO™ Orange (50 x), 5 µL

Elutionsfraktion mit His-XylR_{B.meg} (0,5 mg/mL) und 5 µL des vorher ermittelten Puffers (8 x konzentriert) sowie 35 µL des jeweiligen Additivs in einer 96-Wellplatte zusammenpipettiert. Die Auswertung erfolgt wie oben beschrieben. Bei den zu untersuchenden Additiven handelt es sich um Glycerol (1 - 20 % (w/v)), DTT (1 – 5 mM), DMSO (3 % (w/v)), TritonX-100 (0,01 % (w/v)), PEG 200 (5 % (w/v)), Harnstoff (10 mM), Saccharose (3 % (w/v)), Glukose (3 % (w/v)), Imidazol (50 – 400 mM) und Xylose (0,5 – 5 % (w/v)) in unterschiedlichen Kombinationen und mit unterschiedlichen Konzentrationen.

3.7.8 Proteinanalyse mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Native PAGE)

Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Native PAGE) wird verwendet, um Proteine in ihrem nativen Zustand gelelektrophoretisch aufzutrennen. Diese Methode ermöglicht somit Protein-Substrat-Komplexe oder Proteinkomplexe zu analysieren. Die Proteine werden in der nativen PAGE in Abhängigkeit von ihrer Eigenladung, Tertiärstruktur und Molekülmasse getrennt. Um den nativen Zustand der Proteine zu erhalten, wird auf denaturierende und reduzierende Detergenzien, wie SDS oder β-Mercaptoethanol in allen Puffern und Gelen verzichtet.

Für die native PAGE werden 15 µL gereinigtes His-XylR_{B.meg} (0,3 mg/mL) mit 5 µL nativem Probenpuffer gemischt und auf ein 12 %iges natives Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 45 min bei 45 mA pro Gel. Die Gele wurde anschließend mit Coomassie Brilliant Blue G-250 gefärbt und zur Dokumentation fotografiert.

Acrylamid-Stammlösung

Acrylamid	30 % (w/v)
N,N'-Methylenbisacrylamid	1 % (w/v)

Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung

APS	10 % (w/v)
-----	------------

Trenngel [12%ig (w/v)]

H ₂ O _{deion.}	7 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	5 mL
Acrylamid-Stammlösung	8 mL
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	20 µL
APS-Lösung	200 µL

Sammelgel [6%ig (w/v)]

H ₂ O _{deion.}	5,5	mL
500 mM Tris-HCl, pH 6,8	2,5	mL
Acrylamid-Stammlösung	2,0	mL
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	10,0	µL
APS-Lösung	100,0	µL

4 x nativer-Probenpuffer

Glycerin	40	% (w/v)
Bromphenolblau	3	mM
Tris-HCl, pH 6,8	100	mM

Färbelösung

Essigsäure	10	% (v/v)
Coomassie Brilliant Blue G-250	1	g/L

Entfärbelösung

Ethanol	30	% (v/v)
Essigsäure	10	% (v/v)

10 x nativer Laufpuffer

Tris-Base	250	mM
Glycin	2	M

3.7.9 Gelretardationsassay mit His-XylR_{B.meg} mit und ohne gebundener Xylose

Gelretardationsassays oder „Electrophoretic mobility shift assays“ (EMSA) dienen zum Nachweis und zur Identifizierung von *in vitro* DNA-Protein Interaktionen. Hierbei wird ein ausgewähltes DNA-Fragment mit einem bestimmten Protein inkubiert. Diese Probe wird in einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die DNA mittels geeigneter Methoden sichtbar gemacht. DNA-Protein-Komplexe wandern aufgrund ihrer Größe langsamer im Polyacrylamidgel und zeigen somit ein deutlich verändertes Laufverhalten im Vergleich zur unkomplexierten DNA. Dadurch hinterlässt der DNA-Protein-Komplex den so genannten „Shift“ im Gel.

3.7.9.1 Gelretardationsassay und Detektion der DNA mit Ethidiumbromid

Amplifizierung der *xyIR*-Binderegion

Für die Analyse einer Interaktion zwischen einem Protein und einem bestimmten DNA-Fragment muss die entsprechende DNA zunächst *in vitro* mittels PCR vervielfältigt werden, um in ausreichender Menge vorzuliegen.

Für die Analyse der DNA-Protein Bindung wurde zunächst ein 349 bp-langes DNA Fragment aus der genomischen DNA von *B. megaterium* DSM319 mit dem Primern SW11fw und SW12rv mit Hilfe der Phusion-Polymerase (New England Biolabs) amplifiziert. Das PCR-Fragment enthält die intergenische Region von *xyIR* und *xyIA* sowie einen kurzen Teil (124 bp) des *xyIA*-Gens. Es handelt sich hierbei um die Position -137 bis +212 in Bezug auf den *xyIA*-Transkriptionsstart. Außerdem wurde ein 136 bp-langes DNA Fragment des *xyIA*-Gens amplifiziert (Primer SW13fw und SW12rv), das keine potenzielle Bindestelle für den Repressor enthält und als Negativkontrolle dienen sollte. Es handelt sich hierbei um die Position -77 bis +212 in Bezug auf den *xyIA*-Transkriptionsstart. Das PCR-Produkt wurde mit dem PCR Purification Kit (Qiagen, Deutschland) nach Herstellerangaben gereinigt. Die Konzentrationsbestimmung der PCR-Fragmente erfolgte am Nanodrop (Nanodrop ND-1000, GE Healthcare).

Tabelle 13: PCR-Programm für die Amplifizierung der *xyIR*-Binderegion.

Temperatur	Zeit	} 29 Zyklen
98 °C	30 s	
98 °C	10 s	
55 °C	20 s	
72 °C	60 s	
72 °C	600 s	

Bindereaktion

Für die DNA-Protein Bindereaktion wurde der gereinigte Xylose-Repressor (His-XylR_{B.meg}) mit bzw. ohne gebundene Xylose und das 349 bp-lange PCR-Fragment sowie die 136 bp-lange Negativkontrolle eingesetzt. In den 20 µL-Reaktionsmix wurden 25 nM DNA, 50 nM DNA-Negativkontrolle, 2 µL 10 x Bindepuffer, 10-1250 nM gereinigtes His-XylR_{B.meg} und die entsprechende Menge Milli-Q zusammenpipettiert und 30 min bei RT inkubiert.

10 x Bindepuffer

Tris-HCl, pH 7,5	250	mM
KCl	1000	mM
EDTA	1	mM
MgCl ₂	50	mM
BSA	500	µg/mL
Glycerin	50	% (v/v)
DTT	10	mM

Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die DNA-Protein-Komplexe und die unkomplexierte DNA aufzutrennen, wurde eine native PAGE durchgeführt. Komplexe wandern aufgrund ihrer Größe im nativen Gel langsamer als freie DNA und zeigen daher ein unterschiedliches Laufverhalten in der nativen PAGE.

Eine Stunde vor dem Beladen der Polyacrylamidgele wurde eine Spannung angelegt (100 V), um Temperaturunterschiede im Gel auszugleichen. Als Laufpuffer wurde ein 0,5 x TBE-Puffer verwendet. Um unpolymerisierte Gelreste zu entfernen, wurden die Geltaschen vor dem Auftragen der Proben mit einer Kanüle gespült. Nach der Inkubation wurden die Ansätze im 5 %igen nativen Polyacrylamidgel bei 100 V für circa 60 min aufgetrennt (Biorad, Mini Protean III System).

Acrylamid-Stammlösung (Rotiphorese Gel 40, 29:1, Roth A515.1)

Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 29:1	40	% (w/v)
--	----	---------

Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung

APS	10	% (w/v)
-----	----	---------

Polyacrylamidgel [5 %ig (w/v), für 4 Minigele]

10 x TBE	1,0	mL
Acrylamid-Stammlösung	2,5	mL
H ₂ O _{deion.}	15,8	mL
TEMED	32,0	µL
APS	132,0	µL

10 x TBE-Puffer

Tris	890	mM
Borsäure	890	mM
EDTA	20	mM

Detektion durch Ethidiumbromid

Um die DNA im nativen Gel zu detektieren, wurde zunächst eine der beiden Glasplatten entfernt. Die zweite Glasplatte, auf der das Gel haftete, wurde in eine große Petrischale gelegt. Das Gel wurde für 20 min mit 0,1 %iger Ethidiumbromidlösung bedeckt. Nach dem Spülen mit H₂O wurde das Gel in der Geldokumentationsanlage (DeVision DBox, Decon Science Tec) mit UV-Licht (312 nm) bestrahlt. Die Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids konnte durch die Aufnahme mit einer Kamera sichtbar gemacht werden.

Ethidiumbromidlösung

Ethidiumbromid

0,1 % (w/v)

- in H₂O_{deion.} gelöst

3.7.9.2 Gelretardationsassay und Immunodetektion der DNA**DIG-Markierung von DNA-Fragmenten mittels Kit**

Für eine sensitivere Analyse der DNA-Protein Interaktion wurde ein 150 bp-langes DNA Fragment aus dem Plasmid pSSBm85 mit den Primern SW46fw und SW47rv mit Hilfe der Phusion-Polymerase (New England Biolabs) amplifiziert. Das PCR-Fragment enthält die Operator- und Promotorregionen von *xyIR* und *xyIA* (Scheler *et al.*, 1991) sowie die 15 folgenden Basenpaare am 3'- und 5'-Ende. Es handelt sich hierbei um die Position -104 bis +46 in Bezug auf den *xyIA*-Transkriptionsstart. Das PCR-Produkt wurde mit dem PCR Purification Kit (Qiagen, Deutschland) nach Herstellerangaben gereinigt. Für die Markierung wurden 10 pmol PCR-Produkt eingesetzt und mit dem DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit, 2nd Generation (Roche, Deutschland) nach Herstellerprotokoll mit Digoxigenin (DIG) markiert. Hierbei überträgt eine terminale Transferase Digoxigenin markierte ddUTPs an das 3'-Ende des PCR-Produkts. Anschließend wurde der Ansatz mit dem PCR Purification Kit erneut gereinigt und mit 50 µL 2 mM Tris-HCl, pH 8,5 eluiert.

Tabelle 14: PCR-Programm für die Amplifizierung der Operator- und Promotorregion.

Temperatur	Zeit	
98 °C	30 s	} 34 Zyklen
98 °C	10 s	
50 °C	20 s	
72 °C	60 s	
72 °C	600 s	

Bindereaktion

Für die DNA-Protein Bindereaktion wurde der gereinigte Xylose-Repressor (His-XylR_{B.meg}) mit und ohne gebundene Xylose und das 150 bp-lange DIG-markierte PCR-Produkt eingesetzt. In den 10 µL-Reaktionsmix wurden 5 nM markierte DNA, 1 µL 10 x Bindepuffer, 125-1000 nM gereinigtes His-XylR_{B.meg} und die entsprechende Menge Milli-Q zusammenpipettiert und 45 min bei RT inkubiert.

10 x Bindepuffer

Tris-HCl, pH 7,5	250 mM
KCl	1000 mM
EDTA	1 mM
MgCl ₂	50 mM
BSA	500 µg/mL
Glycerin	50 % (v/v)
DTT	10 mM

Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Eine Stunde vor dem Beladen der Polyacrylamidgele wurde eine Spannung angelegt (100 V), um Temperaturunterschiede im Gel auszugleichen. Als Laufpuffer wurde ein 0,5 x TBE-Puffer verwendet. Um unpolymerisierte Gelreste zu entfernen, wurden die Geltaschen vor dem Auftragen der Proben mit einer Kanüle gespült. Nach der Inkubation wurden die Ansätze im 6 %igen nativen Polyacrylamidgel bei 100 V für circa 105 min aufgetrennt (Biorad, Mini Protean III System).

10 x TBE-Puffer

Tris	890 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	20 mM

Acrylamid-Stammlösung (Rotiphorese Gel 40, 29:1, Roth A515.1)

Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 29:1	40 % (w/v)
--	------------

Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung

APS	10 % (w/v)
-----	------------

Polyacrylamidgel [6%ig (w/v), für 4 Minigele]

10 x TBE	1 mL
Acrylamid-Stammlösung	3 mL
H ₂ O _{deion.}	15 mL
TEMED	32 µL
APS	132 µL

Kontaktblot

Um die DNA zu detektieren, wurde zunächst eine der beiden Glasplatten entfernt. Die zweite Glasplatte, auf der das Gel haftete, wurde auf eine ebene Fläche gelegt. Die DNA wurde auf eine Nylonmembran (NytranN, GE Healthcare) transferiert, indem eine passend zugeschnittene Membran aufgelegt wurde. Anschließend wurden drei Lagen Whatman Blotting-Papiere und die zuvor entfernte Glasplatte auf die Membran gelegt und mit einer gefüllten 1 L Schottflasche beschwert. Nach zwei Stunden wurde die vom Gel befreite Membran in eine große Petrischale gelegt und im UV-Crosslinker (Stratagene, UV Stratalinker 2400) mit dem Programm Autocrosslink behandelt, um die DNA auf der Membran zu fixieren. Die Membran wurde eingerollt, ü.N. bei 4 °C in einem verschlossenen Falcon gelagert oder sofort weiter behandelt.

Immunodetektion mit CDP-Star

Für die Immunodetektion wurde der Anti-Digoxigenin Antikörper (Roche, Deutschland) verwendet, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt ist und der an die DIG-markierten PCR-Fragmente binden kann. Die alkalische Phosphatase katalysiert die Umsetzung des Substrates CDP-Star (Roche, Deutschland), wobei eine Chemilumineszenz entsteht. Diese kann durch die Aufnahme mit einer CCD-Kamera detektiert gemacht werden.

Für die Detektion der DIG-gelabelten DNA wurde die Membran in eine Schale gelegt und 5 min mit 10 mL Waschpuffer auf einer Wippe gewaschen. Anschließend wurde der Waschpuffer verworfen und die Membran für 40 min mit 10 mL 1 x Blockingsolution (Roche, Deutschland), in Maleinsäurepuffer verdünnt, inkubiert. Danach wurde die Nylonmembran mit 10 mL DIG-Antikörperlösung für 30 min versetzt. Die Membran wurde viermal für 10 min mit 10 mL Waschpuffer gewaschen, für 5 min in 10 mL Detektionspuffer inkubiert, in eine Einschweißfolie gelegt und mit

1 mL CDP-Star Lösung beträufelt. Die Einschweißfolie wurde glatt gestrichen und die Membran luftblasenfrei eingeschweißt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln und für 1 h bei RT. Danach konnte die Chemilumineszenz der DIG-gelabelten DNA durch die Aufnahme mit einer CCD-Kamera detektiert werden.

Maleinsäurepuffer

Maleinsäure	100 mM
NaCl	150 mM
• mit NaOH auf pH 7,5 einstellen	

Waschpuffer

Tween 20	3 mL
Maleinsäurepuffer, pH 7,5	1 L

Detektionspuffer

Tris-HCl, pH 9,5	100 mM
NaCl	100 mM

10 x Blockingsolution

Blocking-Reagenz (Roche, Deutschland)	5 g
Maleinsäurepuffer, pH 7,5	50 mL

DIG-Antikörperlösung

1 x Blockingsolution	10 mL
Anti-DIG	0,5 µL

CDP-Star Lösung

Detektionspuffer	1 mL
CDP-Star	10 µL

3.7.10 DNaseI-Footprint von His-XylR_{B.meg} mit und ohne gebundener Xylose

Ein DNaseI-Footprint ist ein Verfahren zur Bestimmung der DNA-Sequenz von Proteinbindestellen. Bei dieser Methode wird die markierte DNA enzymatisch mit DNaseI gespalten, wobei die Stellen, an denen ein Protein bindet, vor dem enzymatischen Verdau geschützt sind. Nach dem Verdau entstehen DNA-Bruchstücke verschiedener Länge, die in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und detektiert werden. Bindet ein Protein an die DNA und schützt diese vor dem Verdau, fehlen DNA-Fragmente bestimmter Länge, was durch eine Lücke im Polyacrylamidgel sichtbar wird. Sie hinterlassen den sogenannten „Fußabdruck“ bzw.

„footprint“ auf der DNA. Mit Hilfe einer Sequenzierreaktion des eingesetzten DNA-Fragments, die parallel im Gel mit aufgetrennt wird, ist es möglich, die Basensequenz der Proteinbindestelle zu ermitteln.

DIG-Markierung von DNA-Fragmenten mittels Primer

Für die DNaseI-Footprint-Analysen wurde die 225 bp-lange intergenische Region von *xyIR* und *xyIA* mittels DIG-markierter Primer (Biomers, Deutschland) und der Phusion-Polymerase (New England Biolabs) amplifiziert. Es handelt sich hierbei um die Position -137 bis +89 in Bezug auf den *xyIA*-Transkriptionsstart. Es wurden zwei PCRs durchgeführt, in der jeweils ein DIG-markierter und ein nicht-markierter Primer eingesetzt wurden. Für die erste PCR wurde die Primer-Kombination DIG-SW61 und SW62 (10 pmol/μL) eingesetzt, was zur DIG-Markierung des codierenden Stranges am 3'-Ende führte. Für die Markierung des nicht-codierenden Stranges wurde die Primer-Kombination SW61 und DIG-SW62 (10 pmol/μL) verwendet. Als Template diente das Plasmid pSSBm85 (4 ng/μL). Das PCR-Produkt wurde mit dem PCR Purification Kit (Qiagen, Deutschland) nach Herstellerangaben gereinigt.

Tabelle 15: PCR-Programm für die Amplifizierung der intergenischen Region von *xyIR* und *xyIA*.

Temperatur	Zeit	
98 °C	30 s	} 34 Zyklen
98 °C	10 s	
53 °C	20 s	
72 °C	60 s	
72 °C	600 s	

Bindereaktion, Verdau und Fällung der DNA

Für die DNA-Protein Bindung wurden 12 nM DIG-markiertes PCR-Fragment, 250-1000 nM frisch gereinigtes Protein, 2 μL 10 x Footprint-Puffer und die entsprechende Menge MilliQ in einem 20 μL-Ansatz vereint und 40 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Fragmentierung der DNA, indem jeder Ansatz mit 5 μL DNaseI (Ambion, 2000 U) versetzt wurde. Die Fragmentierung wurde nach 70 s bei RT durch die Zugabe von 50 μL DNase-Stopp-Lösung beendet. Danach wurden die Proben mit 100 μL Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gemischt und 30 min bei RT und 18000 x g zentrifugiert. Die DNA-haltige wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, welches 25 μL 10 M Ammoniumacetat,

2 µL Glykogen (20 µg/µL) und 500 µL eiskaltes 100 %iges Ethanol enthält. Um die DNA zu fällen, wurden die Anätze mindestens 30 min bei -20 °C inkubiert und anschließend für 20 min und 18000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Die sedimentierte DNA wurde mit 70 %igen Ethanol gewaschen und anschließend im Thermomixer getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in 7 µL verdünnter (1:2 mit H₂O_{deion.}) Stopp-Lösung (Thermo Sequenase Sequencing Kit, USB) gelöst und bei -20 °C gelagert.

10 x Footprint-Puffer

Tris-HCl, pH 8,0	200 mM
EDTA, pH 8,0	1 mM
DTT	5 mM
KCl	500 mM
Ficoll 400	30 % (w/v)
MgCl ₂	50 mM

DNase-Stopp-Lösung

EDTA, pH 8,0	15 mM
Hefe Carrier t-RNA (Sigma, R5636)	10 µg/mL
<ul style="list-style-type: none"> • in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 lösen 	

Sequenzierreaktion

Mit Hilfe einer Sequenzierreaktion des für die Footprint-Analysen eingesetzten DNA-Fragments kann die Basensequenz der Proteinbindestelle ermittelt werden. Die Sequenzierreaktion wurde mit dem Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB, USA) durchgeführt. Es wurden zwei Mastermixe angesetzt, die jeweils 2 µL Thermo Seq Reaction Buffer, 1 µL Plasmid pSSBm85 (100 ng/µL), 2 µL Thermo Sequenase DNA-Polymerase (4 U/µL) und 11,5 µL steriles H₂O_{deion.} enthielten. Zum ersten Mastermix wurde 1 µL DIG-markierter Primer DIG-SW61 (10 pmol/µL) hinzugefügt, der für die Sequenzierung des codierenden Stranges diente. Für die Sequenzierung des nicht-codierenden Stranges wurde zum zweiten Mastermix 1 µL DIG-markierter Primer DIG-SW62 (10 pmol/µL) gegeben. Zum Aufteilen des Mastermixes wurden je vier 0,2 mL-Reaktionsgefäße bereitgestellt. In die Reaktionsgefäße wurden jeweils 4 µL eines ddNTPs pipettiert (ddA, ddT, ddG oder ddC), die als Terminationsmixe im Kit enthalten sind. Die Terminationsmixe enthielten jeweils eines der vier ddNTPs und alle vier dNTPs. Danach wurden je 4 µL der jeweiligen Mastermixe zu den

ddNTPs pipettiert und die Sequenzierreaktion im Thermocycler (T personal, Biometra) gestartet.

Tabelle 16: PCR-Programm für die Sequenzierreaktion.

Temperatur	Zeit	
98 °C	30 s	} 40 Zyklen
95 °C	30 s	
55 °C	30 s	
72 °C	60 s	
72 °C	600 s	

Nach der Sequenzierung wurde jeder Ansatz mit 4 µL Stopp-Lösung (Thermo Sequenase Sequencing Kit, USB) versetzt und bei -20 °C eingefroren. Das in der Stopp-Lösung enthaltene Formamid und EDTA inaktiviert alle enzymatischen Aktivitäten nach Beendigung der Sequenzierreaktion.

Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Kontaktblot

Um die fragmentierte DNA und parallel die Sequenzierreaktion aufzutrennen, wurde zunächst eine Harnstoff-PAGE durchgeführt. Diese Methode beruht auf einer denaturierenden Elektrophorese, die in der Lage ist, DNA-Fragmente, die sich nur in einer Base unterscheiden, zu trennen.

Vor dem Zusammenbauen der gereinigten Glasplatten wurde eine Platte mit PlusOne Repel-Silane ES (Amersham BioSciences) beschichtet. Dann wurde die 6 %ige Harnstoff-Polyacrylamidgel-Lösung luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen und mindestens eine Stunde gelagert, um vollständig auszupolymerisieren. Vor dem Auftragen der Proben wurde ein Vorlauf in 1 x TBE-Puffer gestartet, um Temperaturunterschiede im Gel auszugleichen (30 min, 2500 V). Die Proben wurden für 3 min bei 85 °C erhitzt. Danach wurden 3 µL Probe in die gespülten Taschen pipettiert und bei 2500 V für 70 min elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Beendigung des Laufs wurde die mit Silan behandelte Glasplatte entfernt. Für den Kontaktblot wurde eine positiv geladene Nylonmembran (Roche, Deutschland) sowie vier Lagen Whatman Blotting-Papiere und die entfernte Glasplatte auf das Gel auflegt und das ganze mit einer gefüllten 500 mL Schottflasche beschwert. Die Inkubation des Blots erfolgte für 3 h bei RT. Die vom Gel befreite Membran wurde im UV-Crosslinker (Stratagene, UV Stratalinker 2400)

mit dem Programm Autocrosslink behandelt, um die DNA auf der Membran zu fixieren. Anschließend konnte die trockene Membran zwischen zwei Whatmanpapieren bei 4 °C gelagert werden.

Harnstoff-Polyacrylamidgel

Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30 % (29:1)	14 mL
10 x TBE	7 mL
Harnstoff	29,4 g
APS (10 % (w/v))	560 µL
TEMED	28 µL
• mit H ₂ O _{deion.} auf 70 mL auffüllen	

10 x TBE-Puffer

Tris-HCl	890 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	20 mM

Immunodetektion mit CDP-Star und Auflegen eines Röntgenfilms

Die auf der Membran fixierte DNA wurde für die Visualisierung mit einem Anti-DIG-Antikörper (Roche, Deutschland) inkubiert, der an die DIG-endmarkierten DNA-Fragmente bindet. Der Antikörper ist mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt, der das Substrat CDP-Star (Roche, Deutschland) umsetzt, wodurch eine Chemilumineszenz entsteht. Die Chemilumineszenz färbt Röntgenfilme schwarz, wodurch die einzelnen DNA-Fragmente sichtbar werden.

Zunächst wurde die Membran in einer großen Schale für 5 min mit 100 mL Waschpuffer auf einer Wippe gewaschen. Danach wurde die Membran 40 min mit 100 mL 1 x Blockingsolution (Roche, Deutschland) und 30 min mit 50 mL DIG-Antikörperlösung inkubiert. Die Membran wurde viermal für 10 min mit 100 mL Waschpuffer gewaschen und für 5 min mit 100 mL Detektionspuffer versetzt. Die Membran wurde in eine Einschweißfolie gelegt und mit 6 mL CDP-Star Lösung beträufelt. Die Einschweißfolie wurde glatt gestrichen und die Membran luftblasenfrei eingeschweißt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für 1 h bei RT. Danach konnte die Chemilumineszenz der DIG-gelabelten DNA durch das Auflegen eines Röntgenfilms detektiert werden.

Der Röntgenfilm wurde dazu in einer Röntgenfilmkassette für 5 - 15 min belichtet. Danach erfolgt eine Schalenentwicklung, wobei der Röntgenfilm 90 s unter leichtem Schütteln in eine Entwicklerlösung (Citroline2000 Entwicklerkonzentrat, Adefo-

Chemie GmbH) getaucht wurde. Danach wurde der Röntgenfilm mit Wasser gespült, für 3 min in der Fixierlösung (Adefofix Fixierkonzentrat Part 1 und Härtelösung X für Fixierbäder, Adefo-Chemie GmbH) inkubiert und wieder mit Wasser gespült. Bei nicht-optimalen Ergebnissen wurden die Belichtungszeiten und die Inkubationszeiten in den Entwickler- und Fixierbädern variiert.

Maleinsäurepuffer

Maleinsäure	100	mM
NaCl	150	mM
• mit NaOH auf pH 7,5 einstellen		

Waschpuffer

Tween 20	3	mL
Maleinsäurepuffer, pH 7,5	1	L

Detektionspuffer

Tris-HCl, pH 9,5	100	mM
NaCl	100	mM

10 x Blockingsolution

Blocking-Reagenz	5	g
Maleinsäurepuffer, pH 7,5	50	mL

DIG-Antikörperlösung

1 x Blockingsolution	50	mL
Anti-DIG	5	µL

CDP-Star Lösung

Detektionspuffer	5,94	mL
CDP-Star	60	µL

3.7.11 Generierung von monoklonalen Antikörpern und Immunodetektion

Antikörpergenerierung gegen His-XylR_{B.meg}

Monoklonale Antikörper sind Antikörper, die sich gegen ein bestimmtes, einzelnes Epitop richten. Um monoklonale Antikörper zu generieren, kann die Hybridom-Technik verwendet werden. Bei dieser Technik werden einer vorher immunisierten Maus B-Lymphozyten aus der Milz entnommen, die den gewünschten Antikörper produzieren. Diese B-Lymphozyten werden mit Myelomzelle fusioniert und weiter vermehrt. Myelomzellen besitzen die Fähigkeit für unbegrenztes Wachstum *in vitro*.

Durch die Fusionierung entstehen Hybridomazelllinien, die die Eigenschaften beider Ursprungszellen besitzen. Somit können Hybridomazellen Antikörper produzieren und *in vitro* unbegrenzt wachsen. Die unsterbliche Hybridomazelllinie kann aufbewahrt werden und der Zellüberstand mit den entsprechenden Antikörpern bei Bedarf geerntet werden.

Die Generierung der monoklonalen Antikörper, darunter die Immunisierung der Mäuse, die Erzeugung der Hybridomazellen, die Western-Blot-Analyse und die ELISA-Tests, übernahm Sabine Buchmeier (Antibody Facility, TU Braunschweig). Die Produktion und Reinigung der Proteine für die Immunisierung sowie das Transferieren der Proteine auf die Membranen wurden eigenständig durchgeführt.

Für die Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen His-XylR_{B.meg} wurde das Protein rekombinant in *E. coli* produziert. Für die Produktion des Repressors wurde LB-Medium mit 0,5 % Xylose verwendet. Zusätzlich wurde das Protein His-HemC_{B.meg} in *E. coli* produziert, was später lediglich dazu dienen sollte, Antikörper gegen den His-Tag auszuschließen. Die Proteine wurden affinitätschromatographisch gereinigt und gegebenenfalls konzentriert. Für die Immunisierung wurde den Mäusen dreimal wenige µL frisches His-XylR_{B.meg} (1 mg/mL) gespritzt. Nach acht Wochen erfolgte die Erzeugung der Hybridomazellen, die jeweils einen spezifischen monoklonalen Antikörper produzierten. Daraufhin wurden die produzierten Antikörper mittels Western-Blot-Analyse analysiert. Für die Western-Blot-Analyse (Kapitel 3.7.6) wurden die gereinigten Proteine (His-XylR_{B.meg}, His-HemC_{B.meg}) auf Membranen transferiert und mit den Zellkulturüberständen der Hybridomazellen, die monoklonalen Anti-XylR-Antikörper enthalten sollten, inkubiert. Danach erfolgte die Behandlung mit dem sekundären Anti-Maus-Antikörper, der an eine Horseradish Peroxidase gekoppelt ist, die das Substrat ECL Plus umsetzt, wobei eine Chemilumineszenz entsteht. Diese Chemilumineszenz kann mit einem Laser Scanner detektiert werden.

Die Hybridomazelllinien, die Antikörper gegen den Xylose-Repressor produzierten und somit ein Signal in der Western-Blot-Analyse zeigten, wurde vermehrt und für weitere Tests eingesetzt. Um besonders sensitive Antikörper zu identifizieren, wurde für das weitere Screening Zellextrakt aus *B. megaterium* eingesetzt. Der Zellextrakt aus *B. megaterium* DSM319 in LB-Medium mit 0,5 % Xylose wurde auf mehrere Membranen transferiert und für die Western-Blot-Analyse eingesetzt. Als

Negativkontrolle diente der transferierte Zellextrakt aus einer *B. megaterium* *xylR*-Mutante (WH321) (Rygus & Hillen, 1992).

Die Hybridomazelllinie, die spezifische monoklonale Antikörper produzierte, wurde weiter vermehrt und der Antikörper-enthaltene Zellkulturüberstand für einen abschließenden ELISA-Test mit His-XylR_{B.meg} und His-HemC_{B.meg} als Antigen eingesetzt.

Alle verwendeten Blots mit transferierten Proteinen wurden nicht nur unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, sondern auch unter nativen Bedingungen mittels nativer PAGE, da die Epitope der Proteine, an die die Antikörper binden, konformationsspezifisch sein können. Konformationsspezifische Epitope würden demnach nur im nativen Zustand von einem Antikörper gebunden werden. Die finale Hybridomazelllinie wurde konserviert und der entsprechende Zellkulturüberstand für die Immunodetektion eingesetzt.

Immunodetektion mit Anti-His-XylR_{B.meg}-Antikörpern in fixierten *B. megaterium*-Zellen

Für die Immunodetektion von XylR_{B.meg} wurden 50 mL A5+4-Medium mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen im 300 mL-Schikanekolben mit Kolonien der entsprechenden Plattenkultur inokuliert. Die Vorkulturen wurden bei 37 °C und 100 rpm ü.N. inkubiert. Die 100 mL A5+4-Hauptkulturen wurden 1:100 angeimpft und bis zu einer OD_{578 nm} von 0,3 - 0,4 bei 37 °C und 220 rpm wachsen gelassen. Danach erfolgte die Induktion mit 0,5 % (w/v) Xylose. Nach drei Stunden wurden 6 mL Kultur geerntet (18000 x g, 5 min) und zweimal in 1 x PBS gewaschen. Das Zellsediment wurde in 500 µL kaltem 1 x PBS aufgenommen und für die Fixierung mit 500 µL eiskaltem 100 %igen Ethanol versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde dreimal invertiert und für 2 min bei 18000 x g zentrifugiert. Danach wurde das Zellsediment zweimal in 1 x PBS gewaschen und schließlich in 50 µL 1 x PBS aufgenommen. Davon wurden je 20 µL auf die Hälfte eines Objektträgers getropft. Nachdem die Zellen auf dem Objektträger getrocknet sind, wurde der Objektträger in 1 x PBS vorsichtig gewaschen und erneut getrocknet. Der Objektträger wurde mit 2 % FCS (fetal calf serum) in 1 x PBS überschichtet und für 30 min bei RT in einer Feuchtkammer inkubiert. Der Objektträger wurde vorsichtig in 1 x PBS gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde das unverdünnte Kulturmedium mit den enthaltenen Anti-XylR-Antikörpern auf den Objektträger getropft und 1 h bei RT in einer Feuchtkammer inkubiert. Im Anschluss wurde der Objektträger in 1 x PBS gewaschen und

getrocknet. Danach wurde der Objektträger mit dem sekundären Anti-Maus-Antikörper (Alexa Fluor® 568, goat anti-mouse IgG, 1:300 in 1 x PBS verdünnt, Invitrogen) überschichtet, der mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Der Objektträger wurde für 1 h bei RT in einer Feuchtkammer inkubiert, wieder in 1 x PBS gewaschen, getrocknet und mit einem Tropfen Dako Fluorescence Mounting Medium (Agilent) überschichtet. Zum Schluss wurde der Objektträger im Dunkeln und bei 4 °C gelagert. Die Aufnahmen erfolgten am Axiovert 200M Mikroskop (Carl Zeiss, Deutschland) unter Verwendung des Filter Sets 43 (Zeiss) mit 630-facher Vergrößerung (siehe 3.6.3). Die aufgenommenen Bilder konnten mit dem Programm AxioVision Rel. 4.8 ausgewertet werden.

10 x PBS

NaCl	1,37	M
KCl	27,00	mM
Na ₂ HPO ₄	100,00	mM
KH ₂ PO ₄	20,00	mM

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Analysen und Bindestudien mit dem gereinigten Xylose-Repressor XylR aus *Bacillus megaterium*

Während der Aufbau des Xylose-Operon aus *B. megaterium* in den vergangenen Jahren sehr gut charakterisiert wurde (Kapitel 1.2.1), fehlen bislang *in vitro* Studien, die die XylR-vermittelte Regulation des Xylose-Operons in *B. megaterium* genauer beschreiben. Nach dem aktuellen Modell erfolgt die Regulation des Xylose-Operons in *B. megaterium* über eine Repressor-vermittelte Genregulation. Dabei bindet der Repressor XylR in Abwesenheit von Xylose an den *xylA*- und *xylR*-Operator, wodurch die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor sterisch behindert wird und die Ausbildung des geschlossenen Komplexes nicht erfolgen kann. Die Transkription der Strukturgene *xylA*, *xylB* und *xylT* sowie *xylR* wird somit verhindert. In Anwesenheit von Xylose hingegen bindet diese an den Repressor, der sich daraufhin von dem Operator löst oder gar nicht erst spezifisch binden kann. Die RNA-Polymerase kann nun an den Promotor binden, was zur Transkription aller *xyl*-Gene führt.

Dieses Modell über die XylR-vermittelte Regulation des Xylose-Operons konnte bisher noch nicht *in vitro* bestätigt werden, da die Produktion und Reinigung des Xylose-Repressors aus *B. megaterium* und auch anderen *Bacillus* sp. bisher erfolglos verlief (Kreuzer *et al.*, 1989; Gärtner *et al.*, 1992; Scheler & Hillen, 1994). Bislang veröffentlichte DNA-Bindestudien wurden nur mit Zellextrakt durchgeführt, so dass zwar erste Hinweise auf das XylR-Bindevverhalten erhalten wurden, aber keine differenzierten Aussagen über das unterschiedliche Verhalten des Repressor mit und ohne Xylose getroffen werden konnten (Gärtner *et al.*, 1992; Dahl *et al.*, 1995).

Mit dem gereinigten Repressor wurden im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* Bindestudien und Proteinanalysen durchgeführt, die die genaue XylR-vermittelte Regulation des Xylose-Operons beschreiben und ergänzen sollen. Hierbei war vor allem das Verhalten der unterschiedlichen Repressor-Formen, mit und ohne gebundene Xylose, von großer Bedeutung, da bisher keine Kenntnisse über die einzelnen Formen und deren Verhalten vorlagen. Mit Hilfe der erfolgreichen Reinigung der beiden Repressor-Formen sollten neue Erkenntnisse über das unterschiedliche DNA-Bindevverhalten der Repressor-Formen (mit und ohne Xylose) und die Oligomerisierung in Abhängigkeit des Induktors gewonnen werden.

4.1.1 Heterologe Produktion des Fusionsproteins His-XylR_{B.meg} in *Escherichia coli*

Zunächst wurde das Repressorprotein aus *B. megaterium* XylR_{B.meg} in *E. coli* rekombinant produziert. Dafür wurden *E. coli* BL21(DE3) pLysS Star-Zellen mit dem Plasmid pRBec2 transformiert, das auf dem Plasmid pET14b basiert und die induzierbare Genexpression und die Produktion des Fusionsproteins His₆-XylR_{B.meg} über den T7-Promoter ermöglicht. Die Produktion von His-XylR_{B.meg} wurde bei unterschiedlichen Temperaturen (17 °C, 25 °C und 37 °C), unterschiedlichen Induktionszeitpunkten (OD_{578 nm} 0,5 und 2) sowie mit oder ohne Zugabe von 0,5 % (w/v) Xylose durchgeführt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten per SDS-Gel analysiert. Die höchste Produktion des rekombinanten Xylose-Repressors zeigte sich bei einer Kultivierungstemperatur von 37 °C, einem Induktionszeitpunkt bei OD_{578 nm} 2 mit 400 µM IPTG, nach einer Kultivierungsdauer von 24 Stunden und mit der Zugabe von 0,5 % (w/v) Xylose parallel zur Induktion mit IPTG.

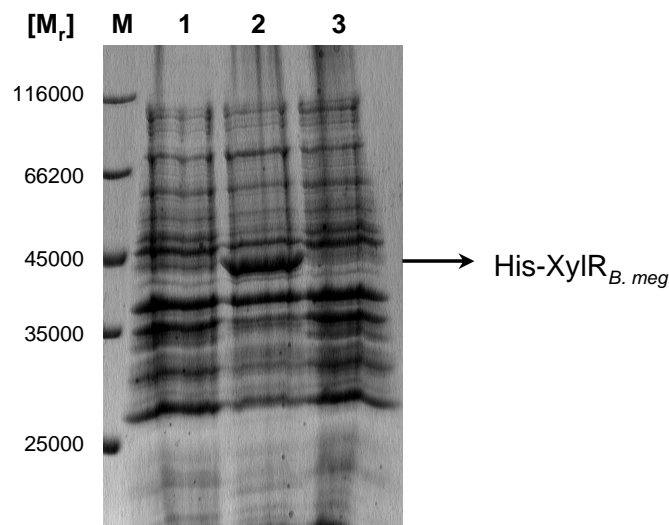


Abb. 10: SDS-PAGE-Analyse der intrazellulären Proteine aus induzierten und nicht-induzierten *E. coli* BL21(DE3) pLysS Star pRBec2-Kulturen. Dargestellt ist die Auftrennung der intrazellulären Proteine aus den Zellen der induzierten (**Bahn 1 und 2**) und nicht-induzierten (**Bahn 3**) Kulturen. Zusätzlich enthält eine induzierte Kultur 0,5 % (w/v) Xylose, die parallel zur Induktion hinzugeben wurde (**Bahn 2**). Die Kultivierung der *E. coli* Kulturen erfolgte bei 37 °C und 220 rpm. Die Induktion erfolgte mit 400 µM IPTG und bei einer OD_{578 nm} von 2. 24 Stunden nach Induktion wurden 500 µL Probe entnommen und die Zellen sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 100 µL SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Davon wurden jeweils 20 µL auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden gelelektrophoretisch getrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Der schwarze Pfeil kennzeichnet das Fusionsprotein His-XylR_{B.meg} (**Bahn 1 und 2**) mit einer relativen Molekülmasse von $M_r = 42710$. **Bahn M**: Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas).

In Abb. 10 ist die SDS-PAGE-Analyse der intrazellulären Proteine aus induzierten und nicht-induzierten *E. coli* BL21(DE3) pLysS Star pRBec2-Kulturen dargestellt. Die

aufgetragenen intrazellulären Proteine stammen aus der Kultivierung mit den ermittelten optimalen Produktionsbedingungen (37 °C, Induktion bei OD_{578 nm} 2, Inkubation über Nacht). In der Bahn 1 und 2 ist das rekombinant produzierte His-XylR_{B.meg} mit einer relativen Molekülmasse von M_r = 42710 zu erkennen (auf der Höhe des schwarzen Pfeils). Dabei fällt auf, dass die entsprechende Proteinbande im Gelbild in der Bahn 2 viel dicker ist als im Vergleich zur Bahn 1. Somit hatte die Zugabe von Xylose einen positiven Effekt auf die rekombinante Produktion des Fusionsproteins His-XylR_{B.meg}. Vermutlich bindet die Xylose als natürliches Substrat an XylR und vermittelt eine bessere Stabilität des Proteins. Die Analyse der intrazellulären Proteine aus der nicht-induzierten Kultur zeigten keine Proteinbande auf der entsprechenden Höhe.

4.1.2 Heterologe Produktion und affinitätschromatographische Reinigung des Xylose-Repressors mit unterschiedlichen Tags

Nachdem die optimalen Bedingungen für die Produktion des Fusionsprotein His-XylR_{B.meg} erfolgreich ermittelt wurden, erfolgte die affinitätschromatographische Reinigung des Proteins. Für die Reinigung des Repressors wurde neben dem His₆- auch der StrepII-Tag getestet, da unterschiedliche Tags Einfluss auf Menge, Stabilität und Sauberkeit des gereinigten Proteins haben können. Für die Reinigung wurden jeweils 3 L LB-Kulturen mit *E. coli* BL21(DE3) pLysS Star pRBec2 (für His-XylR_{B.meg}) oder *E. coli* BL21(DE3) pLysS Star pSWec8 (für Strep-XylR_{B.meg}) aerob bei 37 °C kultiviert. Die Kulturen wurden bei einer OD_{578 nm} von 2 mit 400 µM IPTG induziert und über Nacht weiter bei 37 °C inkubiert. Nach der Zellernte wurde das Zellsediment bei -20 °C eingefroren, um die anschließende Lyse der Zellen zu verbessern. Die aufgetauten Zellen wurden mittels Ultraschallhomogenisator aufgeschlossen, zentrifugiert und der zellfreie Extrakt für die affinitätschromatographische Reinigung auf eine „Nickel-Chelating Sepharose“-Tropfsäule (für die Reinigung von His-XylR_{B.meg}) oder „Streptactin Superflow High Capacity“-Tropfsäule (für die Reinigung von Strep-XylR_{B.meg}) gegeben. Die Elution erfolgte mit 400 mM Imidazol (für His-XylR_{B.meg}) bzw. 2,5 mM Destiobiotin (für Strep-XylR_{B.meg}) in 100 mM Natrium-Phosphat Puffer, pH 7,0 mit 500 mM NaCl. Zur Analyse wurden alle Fraktionen per SDS-Gel analysiert (Abb. 11).

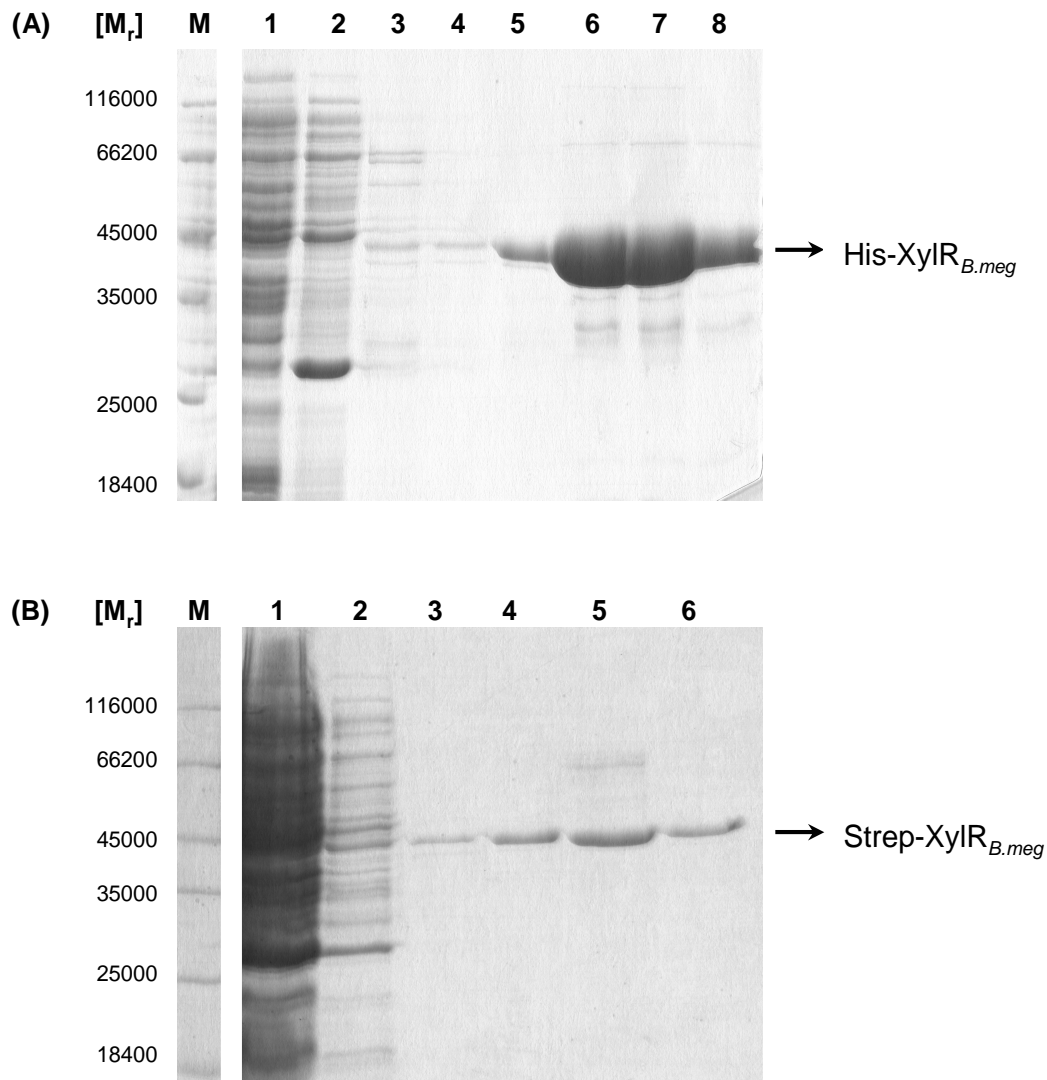


Abb. 11: SDS-PAGE-Analyse nach Reinigung von (A) His-XylR_{B.meg} und (B) Strep-XylR_{B.meg} mittels Affinitätschromatographie. Nach der Produktion aus 3 L LB-Medium, Zellernte und -aufschluss erfolgte die affinitätschromatographische Reinigung von (A) His-XylR_{B.meg} mittels „Nickel-Chelating Sepharose“ als Säulenmaterial und (B) Strep-XylR_{B.meg} mittels „Streptactin Superflow High Capacity“. Die Durchlauf- und Waschfraktionen wurden vollständig aufgefangen und die Elutionsfraktionen (400 mM Imidazol, 2,5 mM Destiobiotin) in mehreren Schritten zu jeweils 1 mL gesammelt. 15 µL jeder Fraktion wurden mit 5 µL SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und in einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Der schwarze Pfeil kennzeichnet das Fusionsprotein (A) His-XylR_{B.meg} mit einer relativen Molekülmasse von $M_r = 42710$ und das Fusionsprotein (B) Strep-XylR_{B.meg} mit einer relativen Molekülmasse von $M_r = 42930$.

Bahn M : Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)

Bahn 1 : Durchlauf

Bahn 2 : Waschfraktion 1 (gewaschen wurde mit (A) 50 mM Imidazol und (B) 0 mM Destiobiotin)

Bahn 3 : Waschfraktion 2 (gewaschen wurde mit (A) 100 mM Imidazol und (B) 0 mM Destiobiotin)

Bahn 4-8 : Elutionsfraktionen (eluiert wurde mit (A) 400 mM Imidazol und (B) 2,5 mM Destiobiotin)

Sowohl His-XylR_{B.meg} als auch Strep-XylR_{B.meg} konnten erfolgreich gereinigt werden (Abb. 11 A und B). In den Elutionsfraktionen treten neben der gewünschten Proteinbande noch kleinere und größere schwächere Banden auf. Diese können auf Verunreinigungen mit Chaperonen, unspezifisch gebundenen Proteinen oder

Abbauprodukten zurückzuführen sein, die aber im Verhältnis zur Menge an gereinigtem Protein sehr gering sind und daher vernachlässigt wurden. Für alle weiteren Arbeiten mit dem Xylose-Repressor wurde das Konstrukt His-XylR_{B.meg} verwendet, da die produzierte und gereinigte Menge an Fusionsprotein wesentlich höher war und die Verunreinigung im Verhältnis zur Fusionsproteinmenge gering.

4.1.3 Verbesserung der Stabilität und Löslichkeit von His-XylR_{B.meg} mittels Thermofluor-Assay

Nach erfolgreicher Reinigung erwies sich das gereinigte Protein His-XylR_{B.meg} als sehr instabil. In den Elutionsfraktionen, die das gereinigte Protein enthielten, war nach wenigen Stunden ein weißer Niederschlag sichtbar. Um für die weiterführenden Analysen des Repressors die Stabilität des gereinigten Proteins zu erhöhen, wurden Puffertests durchgeführt. Durch verbesserte Pufferbedingungen kann ein Protein stabilisiert werden, so dass sich die Löslichkeit erhöht und das Ausfallen verzögert oder ganz verhindert werden kann. Um die geeigneten Pufferbedingungen zu bestimmen, wurde der sogenannte Thermofluor-Assay durchgeführt.

Die Stabilität wurde hierbei durch thermische Denaturierung des Proteins in verschiedenen Puffersystemen (Acetat, Citrat, MES, HEPES, Tris-HCl und CHES mit verschiedenen Konzentrationen an NaCl) und danach unter Zugabe verschiedener Additive, hier Glycerin, DTT, DMSO, TritonX-100, PEG200, Harnstoff, Saccharose, Glukose, Imidazol und Xylose, untersucht. Dazu wurde das Fluorophor Sypro Orange zu jeder zu testenden Bedingung hinzugegeben. Dieses Fluorophor fluoresziert nur, wenn es Protein-gebunden vorliegt. Zu Beginn bei intaktem Protein bindet der Farbstoff nicht. Kommt es nun zur thermischen Denaturierung des Proteins, können hydrophobe Bereiche zugänglich gemacht werden, so dass Sypro Orange binden und fluoreszieren kann. Über die steigende Fluoreszenz bei steigender Temperatur kann die Schmelztemperatur des Proteins ermittelt werden, indem die negative erste Ableitung der Schmelzkurve gegen die Temperatur aufgetragen wird. Je höher die ermittelte Schmelztemperatur eines Proteins in einem bestimmten Puffer ist, desto höher ist seine Stabilität.

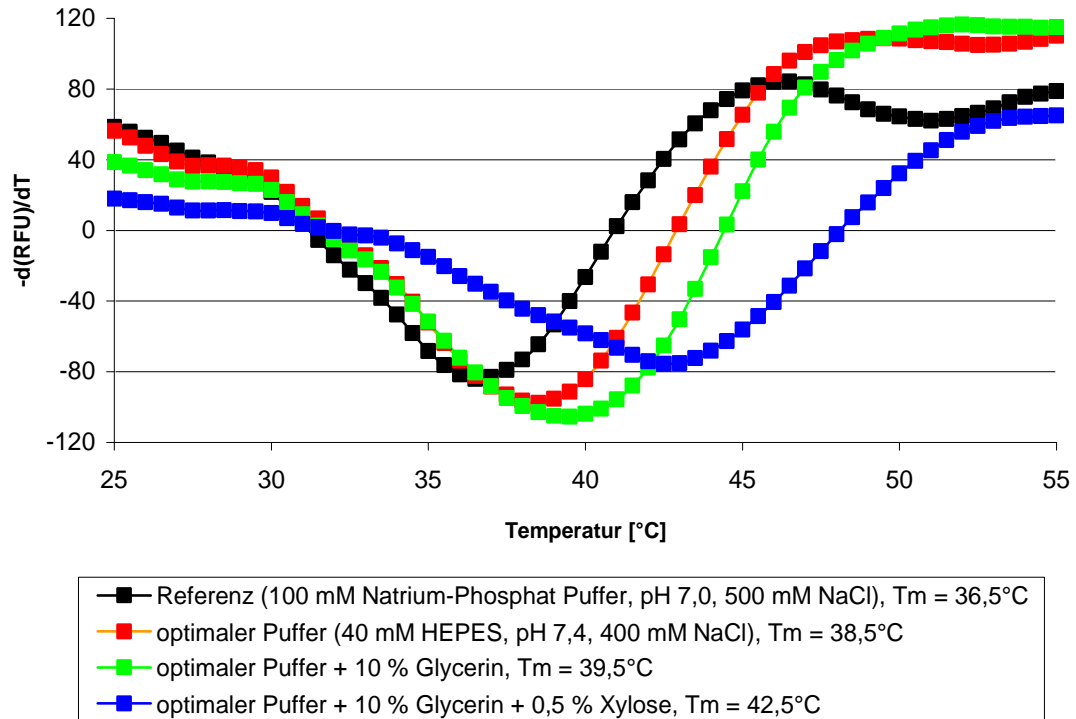


Abb. 12: Ermittelte Schmelzpunkte von His-XylR_{B.meg} in verschiedenen Puffern mittels Thermofluor-Assay. Die erste negative Ableitung, die aus den Schmelzkurven von His-XylR_{B.meg} in verschiedenen Puffern mittels Thermofluor-Assay ermittelt wurde, wurde gegen die Temperatur aufgetragen. Daraus lässt sich die Schmelztemperatur (T_m) von His-XylR_{B.meg} ablesen. Die Abbildung zeigt die Kurven, die eine Schmelzpunkterhöhung im Vergleich zur Referenz zeigten und die somit die neue optimale Pufferzusammensetzung ergeben.

Als Referenz diente das gereinigte Protein im ursprünglichen Elutionspuffer (100 mM Natrium-Phosphat Puffer, pH 7,0, 500 mM NaCl), in dem nach der Proteinreinigung das Ausfallen des Proteins nach einiger Zeit beobachtet werden konnte. Die Messung der Probe im Referenz-Puffer ergab eine Schmelztemperatur von 36,5 °C (Abb. 12, schwarze Kurve). Die Pufferzusammensetzung von 40 mM HEPES, pH 7,4 und 400 mM NaCl ergab eine Schmelzpunkterhöhung von 36,5 auf 38,5 °C (Abb. 12, rote Kurve). Alle anderen Puffersysteme ergaben zunächst keine Veränderung in Bezug auf den Schmelzpunkt oder bewirkten sogar eine Herabsetzung des Schmelzpunktes. Der ermittelte Puffer (40 mM HEPES, pH 7,4, 400 mM NaCl) wurde im Folgenden für den Additiven-Test eingesetzt. Die Zugabe von 10 % Glycerin ergab eine Schmelzpunkterhöhung auf 39,5 °C (Abb. 12, grüne Kurve). Dabei wurde die geringste Glycerinkonzentration gewählt, die noch zu einer Schmelzpunkterhöhung führte. Glycerin wirkt stabilisiert und erhöht die Löslichkeit des Proteins, kann aber in nachfolgenden Versuchen (Protein-Konzentrationsbestimmung, Immunisierung von Mäusen) störend wirken. Bei zusätzlicher Zugabe von 0,5 % (w/v) Xylose stieg der Schmelzpunkt weiter auf

42,5 °C (Abb. 12, blaue Kurve). Alle anderen Additive ergaben keine Veränderung in Bezug auf den Schmelzpunkt oder bewirkten sogar eine Verschlechterung. Dass sich die Zugabe von Xylose stabilisierend auf den rekombinant produzierten Xylose-Repressor auswirkte, konnte bereits während der rekombinanten Produktion in *E. coli* gemacht werden und wurde durch die Ergebnisse des Thermofluor-Assays bestätigt. Somit sollte die stärkere Produktion auf stabileres Protein His-XylR_{B.meg} zurückzuführen sein. Der mittels Thermofluor ermittelte optimale Puffer (40 mM HEPES, pH 7,4, 400 mM NaCl, 10 % Glycerin und 0,5 % (w/v) Xylose) ergab final eine Schmelzpunkterhöhung von insgesamt 6 °C (von 36,5 auf 42,5°C) im Vergleich zur Schmelztemperatur der Probe im Referenz-Puffer und wurde für die folgenden Versuche eingesetzt.

4.1.4 Heterologe Produktion und affinitätschromatographische Reinigung von His-XylR_{B.meg} mit und ohne Xylose in *Escherichia coli*

Nachdem es gelungen war, das His-XylR_{B.meg} affinitätschromatographisch zu reinigen und das gereinigte Protein mittels Thermofluor zu stabilisieren, erfolgte die Produktion und Reinigung des Repressor erneut mit und ohne Xylose. Die Produktion des Xylose-Repressors ohne Xylose erfolgte in M9-Medium, das M9-Salze, Glukose, Magnesiumsulfat und Calciumchlorid enthielt, so dass eine Bindung von Xylose an den Repressor bereits während der Produktion ausgeschlossen werden konnte. Die Produktion des Xylose-Repressors mit Xylose erfolgte weiter in LB-Medium mit der Zugabe von 0,5 % (w/v) Xylose. Die *E. coli* BL21(DE3) pLysS Star pRBec2-Kulturen wurden unter Standardbedingungen (Kapitel 4.1.1) kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und das Zellsediment im entsprechenden Puffer resuspendiert. Dabei enthielt der Puffer für die Zellen aus der Produktion in LB-Medium mit Xylose zusätzlich 0,5 % (w/v) Xylose, die dem anderen Puffer fehlte. Danach wurden die Zellen bei -20 °C eingefroren. Die aufgetauten Zellen wurden mittels Ultraschallhomogenisator aufgeschlossen, zentrifugiert und der zellfreie Extrakt zur affinitätschromatographische Reinigung von His-XylR_{B.meg} genutzt. Der Waschpuffer 1 (50 mM Imidazol) und 2 (100 mM Imidazol) sowie der Elutionspuffer (400 mM Imidazol) enthielten wieder zusätzlich 0,5 % (w/v) Xylose (für die Reinigung des Repressors mit Xylose) oder keine Xylose (für die Reinigung des Repressors ohne Xylose). Alle Fraktionen wurden mittels SDS-Gel analysiert.

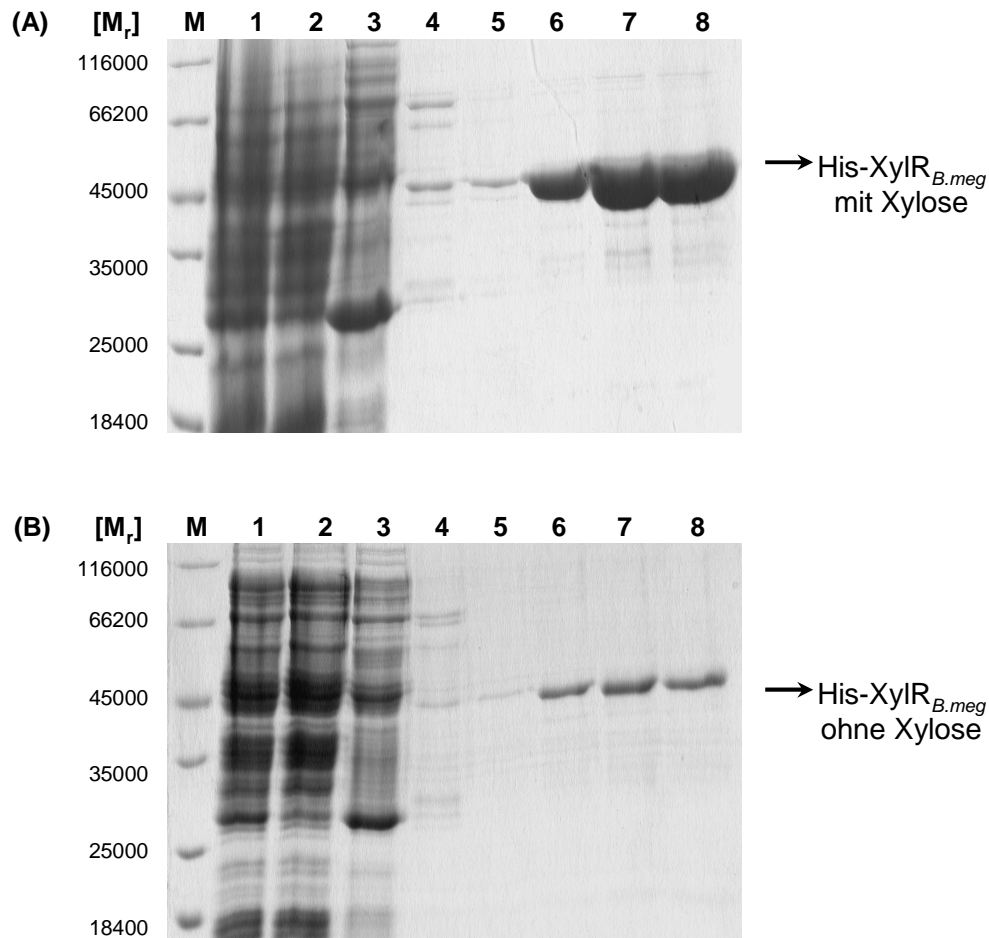


Abb. 13: SDS-PAGE-Analyse nach Reinigung von (A) His-XylR_{B.meg} aus Xylose-haltigem Medium und (B) His-XylR_{B.meg} aus Xylose-freiem Medium mittels Nickel-Äffinitätschromatographie. Nach der Produktion aus 3 L Medium, Zellernte und -aufschluss erfolgte die affinitätschromatographische Reinigung von (A) His-XylR_{B.meg} aus LB-Medium mit 0,5 % (w/v) Xylose und (B) His-XylR_{B.meg} aus M9-Medium ohne Xylose. Die Aufschluss-, Durchlauf- und Waschfraktionen wurden vollständig aufgefangen und die Elutionsfraktionen in mehreren Schritten zu jeweils 1 mL gesammelt. 15 µL jeder Fraktion wurden mit 5 µL SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und in einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

Bahn M : Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)

Bahn 1 : Zellfreier Extrakt

Bahn 2 : Durchlauf

Bahn 3 : Waschfraktion 1 (gewaschen wurde mit 50 mM Imidazol)

Bahn 4 : Waschfraktion 2 (gewaschen wurde mit 100 mM Imidazol)

Bahn 5-8 : Elutionsfraktionen (eluiert wurde mit 400 mM Imidazol)

Die Elutionsfraktionen, die das Fusionsprotein His-XylR_{B.meg} enthalten, zeigten nur wenige Nebenbanden auf dem SDS-Gel, so dass von einer erfolgreichen Reinigung beider Proteine ausgegangen werden konnte. Die Menge an gereinigtem His-XylR_{B.meg} aus Xylose-haltigem Medium war etwa zehnmal höher als die Xylose-freie Variante (Abb. 13). Dies lag zum einen an dem verwendeten LB-Medium, in dem die Kultur eine wesentlich höherer Zelldichte als in dem Xylose-freien M9-Medium erreichte und an der Zugabe der Xylose, die sich positiv auf die Menge und Stabilität

des produzierten Repressors auswirkte. Die Stabilität des gereinigten Proteins erwies sich in dem optimalen Puffer, sowohl ohne als auch mit Xylose, deutlich verbessert. Der gereinigte Xylose-Repressor konnte über Nacht bei 4 °C gelagert werden, ohne dass ein Ausfallen des Proteins beobachtet werden konnte.

4.1.5 Analyse von His-XylR_{B.meg} in Abhängigkeit von Xylose mittels nativer PAGE

Nachdem His-XylR_{B.meg} mit und ohne Xylose produziert und gereinigt wurde, wurden beide Formen über native Gelelektrophorese analysiert, um die zwei unterschiedlichen Formen (+/- gebundene Xylose) zu bestätigen. Bei dieser Methode werden die Proteine keinen denaturierenden und reduzierenden Bedingungen durch SDS und β -Mercaptoethanol oder Erhitzen ausgesetzt, so dass ihre Ladung und natürliche Konformation erhalten bleibt. Substrat-gebundene Proteine besitzen meist eine andere Konformation als die ungebundene Form, so dass sie im nativen Gel ein unterschiedliches Laufverhalten zeigen und unterschieden werden können. Für die native PAGE wurden jeweils 4,5 ng His-XylR_{B.meg} (mit oder ohne Xylose) genommen und mit nativem Probenpuffer gemischt. Die Proteine wurden in einem 12 %igen nativen Gel aufgetrennt und analysiert (Abb. 14).

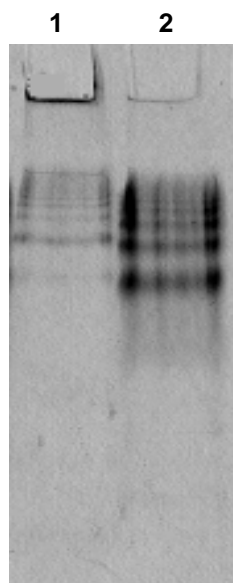


Abb. 14: Analyse des gereinigten (1) His-XylR_{B.meg} aus Xylose-freiem Medium und (2) His-XylR_{B.meg} aus Xylose-haltigem Medium über native PAGE. Nach der Reinigung wurden jeweils 4,5 ng His-XylR_{B.meg} ohne Xylose (**Bahn 1**) und mit Xylose (**Bahn 2**) mit nativem Probenpuffer gemischt. Die Proteine wurden in einem 12 %igen nativen Gel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

Im nativen Gel ist zu erkennen, dass sich das Laufverhalten der gereinigten Xylose-Repressoren ohne (Bahn 1) und mit (Bahn 2) Xylose im nativen Gel deutlich unterscheidet (Abb. 14). Der Xylose-Repressor ohne gebundene Xylose ist nicht vollständig in das Gel eingelaufen und in der Tasche verblieben (Bahn 1). Der Xylose-Repressor mit gebundener Xylose lief vollständig in das Gel ein und zeigte keine Rückstände in der Geltasche. Aus diesen Beobachtungen über das unterschiedliche Laufverhalten wurde geschlossen, dass zwei unterschiedliche Konformationen des Repressor, mit und ohne gebundene Xylose, vorlagen. Es wird vermutet, dass der Repressor ohne gebundene Xylose einen höheren Oligomersierungsgrad besitzt und dadurch eine verminderte Fähigkeit besitzt, in das native Gel einzuwandern. Die Analyse über die native PAGE zeigte außerdem mehrere Proteinbanden pro Bahn. Diese sind vermutlich nicht alle auf unterschiedliche Proteinkomplexe zurückzuführen. Vielmehr wird es sich bei einigen Banden um die leichten Verunreinigungen handeln, die bereits nach der Proteinreinigung sichtbar waren oder um die XylR-Proteine, die sich leicht in ihrer Ladung unterscheiden und deswegen unterschiedlich in das Gel wandern.

4.1.6 *In vitro* Bindestudien von His-XylR_{B.meg} mit und ohne gebundener Xylose mittels Gelretardationsanalysen

Nachdem die zwei His-XylR_{B.meg}-Formen mit und ohne gebundener Xylose anhand der nativen PAGE bestätigt wurden, wurde das jeweilige DNA-Bindevverhalten durch Gelretardationsanalysen untersucht. Durch eine Gelretardationsanalyse können Interaktionen von Proteinen, wie zum Beispiel Transkriptionsregulatoren, mit DNA nachgewiesen werden. Das gereinigte Protein wird mit einem bestimmten DNA-Fragment inkubiert und anschließend über ein natives Polyacrylamidgel aufgetrennt. Findet eine Bindung von DNA und Protein statt, so wandert dieser Komplex langsamer im Gel als das ungebundene DNA-Fragment und wird als sogenannter Shift im Gel sichtbar. Die Gelretardationsanalysen wurden mit gereinigtem His-XylR_{B.meg} mit und ohne gebundener Xylose durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung des Fusionsproteins in den Elutionsfraktionen erfolgte über eine BSA-Standardreihe. Bei der für dieses Experiment eingesetzten DNA handelte es sich um ein 349 bp-langes PCR Fragment, das die intergenische Region zwischen *xylR* und *xylA* sowie einen kurzen Teil (124 bp) des *xylA*-Gens enthält (Abb. 15). Es handelt sich dabei um die Region von Position -137 bis +212 in Bezug

auf den *xyIA*-Transkriptionsstartpunkt. Als DNA-Negativkontrolle wurde ein 136 bp-langes PCR-Fragment eingesetzt, das den Beginn des *xyIA*-Gens enthält, aber keine potenziellen Bindesequenzen für XylR besitzt (Abb. 15). Es handelt sich dabei um die Region von Position +77 bis +212 in Bezug auf den *xyIA*-Transkriptionsstartpunkt. Tritt bei dieser Negativkontrolle dennoch ein Shift in den Gelretardationsexperimenten auf, ist dieser auf eine unspezifische DNA-Bindung von His-XylR_{B.meg} zurückzuführen.



Abb. 15: Aufbau der intergenischen Region zwischen *xyIR* und *xyIA* sowie der 124 bp des *xyIA*-Gens (Position -137 bis +212 in Bezug auf den *xyIA*-Transkriptionsstartpunkt). Dargestellt sind die Operatorsequenzen von *xyIA* (blaue Box) und *xyIR* (rote Box). Die palindromischen Strukturen im Operator sind jeweils unterstrichen. Die -10- und -35-Region der Promotoren sind durch blaue (für *xyIA*) oder rote (für *xyIR*) Rahmen gekennzeichnet. Die -35-Region von *xyIA* und *xyIR* überlappen in einer Base (T). Der Transkriptionsstartpunkt von *xyIA* ist durch einen Pfeil und die Beschriftung „+1“ markiert. Die intergenische Region zwischen *xyIR* und *xyIA* ist in schwarzen Buchstaben dargestellt, Elemente des *xyIR*-Gens in roten und des *xyIA*-Gens in blauen Buchstaben. Die eingezeichneten Positionen (blaue Zahlen) in Bezug auf den *xyIA*-Transkriptionsstartpunkt dienen zur Orientierung der eingesetzten DNA-Fragmente für die nachfolgenden Interaktionsstudien.

Für die Gelretardationsanalysen wurden 25 nM Ziel-DNA, 50 nM DNA-Negativkontrolle, verschiedene Mengen an His-XylR_{B.meg} (10-1250 nM) und entsprechender Puffer gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend

wurden die Ansätze in einem 5 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die DNA mit Ethidumbromid angefärbt (Abb. 16).

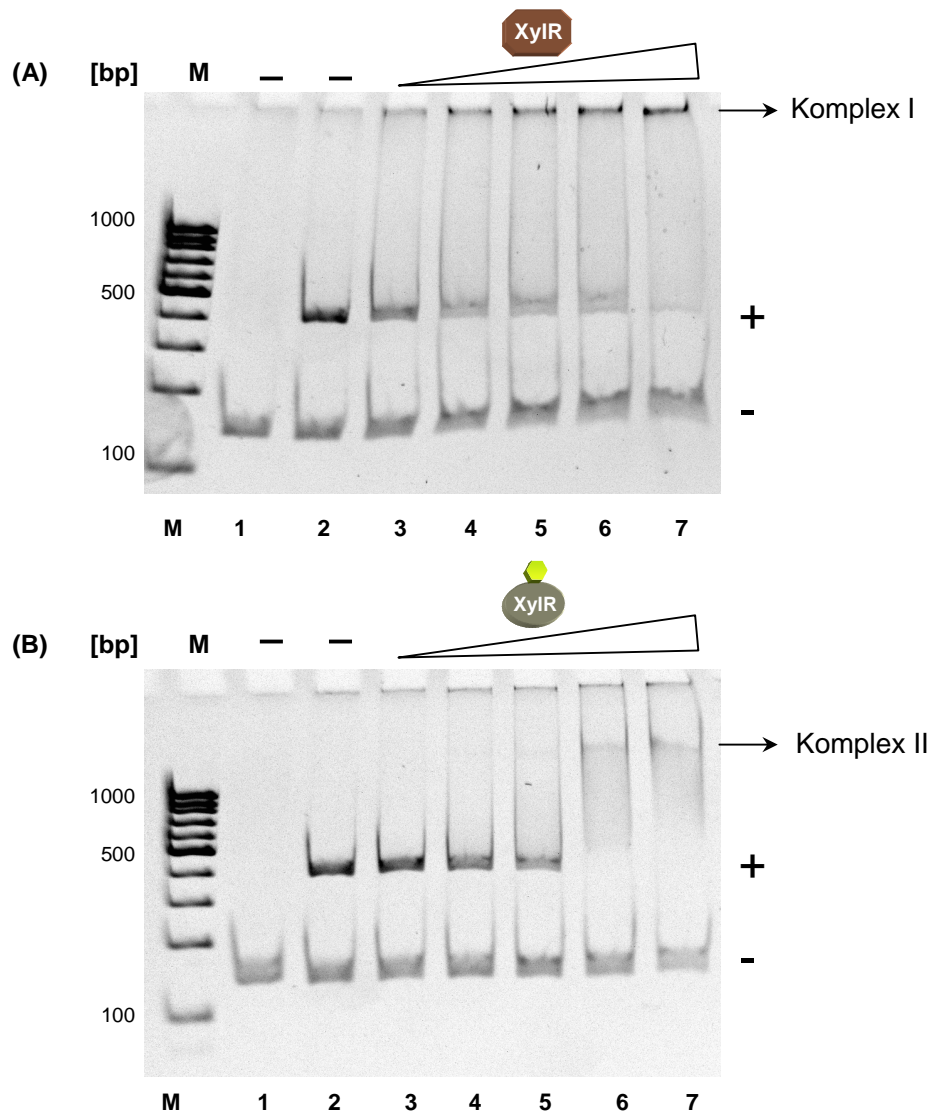


Abb. 16: Gelretardationsanalysen mit gereinigtem His-XylR_{B.meg} (A) ohne und (B) mit gebundener Xylose. Für die Analyse der DNA-XylR-Interaktion wurde ein 349 bp-langes PCR-Fragment (25 nM) verwendet, das die intergenische Region von *xyI*R und *xyI*A sowie einen kurzen Teil (124 bp) des *xyI*A-Gens enthält (Abb. 15). Dieses DNA-Fragment enthält die potenziellen Bindesequenzen für XylR und ist mit einem „+“ gekennzeichnet. Als DNA-Negativkontrolle wurden 50 nM eines 136 bp-langen PCR-Fragments des *xyI*A-Gens verwendet. Dieses DNA-Fragment enthält keine Bindesequenzen für XylR und ist mit einem „-“ gekennzeichnet. Das gereinigte His-XylR_{B.meg} wurde in aufsteigenden Mengen (Spuren 3-7 **(A)** 250, 500, 750, 1000 und 1250 nM und **(B)** 10, 50, 100, 250 und 500 nM) hinzugegeben und bildet mit der Ziel-DNA („+“) den DNA-Protein-Komplex **(A)** I und **(B)** II (schwarzer Pfeil). Das 5 %ige Polyacrylamid-Gel wurde anschließend in Ethidiumbromid gefärbt. Die fluoreszierende DNA konnte nach Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Bahn M : Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Fermentas)

Bahn 1 : kein Protein, nur DNA-Negativkontrolle

Bahn 2 : kein Protein, nur DNA-Negativkontrolle und Ziel-DNA

Bahn 3-7 : **(A)** 250, 500, 750, 1000 und 1250 nM His-XylR_{B.meg} ohne gebundene Xylose und **(B)** 10, 50, 100, 250 und 500 nM His-XylR_{B.meg} mit gebundener Xylose

Die Gelretardationsexperimente zeigten ein grundsätzlich anderes Verhalten bei der Bindung von His-XylR_{B.meg} mit oder ohne gebundener Xylose. Die DNA-Negativkontrolle zeigte keinerlei Shift im Gel, was eine unspezifische Bindung ausschließen lässt. Ohne gebundene Xylose (Abb. 16 A) ist die Ethidiumbromid-gefärbte Ziel-DNA in den Geltaschen verblieben, deren Intensität mit steigender Menge von His-XylR_{B.meg} anstieg. Dies wurde durch die Abnahme der Intensität der Ziel-DNA („+“) mit steigender Proteinmenge bestärkt, was darauf hindeutete, dass die DNA mit dem His-XylR_{B.meg} einen DNA-Protein-Komplex bildet (schwarzer Pfeil, „Komplex I“). In der Bahn ohne His-XylR_{B.meg} war der Komplex in den Taschen nicht zu erkennen. Der Komplex I verblieb somit in den Geltaschen und ist nicht in das Gel eingewandert, so dass kein typischer Shift im Gel zu erkennen war (Abb. 16 A). Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits während der Analyse der nativen PAGE gemacht (Abb. 14) und ist vermutlich auf einen hohen Oligomerisierungsgrad des Xylose-Repressors zurückzuführen. Möglich ist hier auch eine DNA-Protein Konformation, die das Einlaufen in das Gel verhindert.

Bei den Proben von His-XylR_{B.meg} mit Xylose war ein deutlicher Shift im Gel zu erkennen (Abb. 16 B). Außerdem nahm die Intensität der Ziel-DNA („+“) mit steigender Menge an His-XylR_{B.meg} mit gebundener Xylose ab oder verschwand (250-500 nM), was auf die Bildung eines DNA-Protein-Komplexes (schwarzer Pfeil, „Komplex II“) zurückzuführen ist. Die Analyse der Negativkontrolle zeigte auch hier keine Veränderung bei der Intensität, so dass XylR nicht an die Negativkontrolle gebunden hat und keine unspezifischen Wechselwirkungen von DNA und Protein auftraten.

Dieses Ergebnis war so nicht zu erwarten. Bisher wurde davon ausgegangen, dass der Xylose-freie Repressor in Abwesenheit von Xylose an den Operator bindet. In Anwesenheit von Xylose hingegen führt die Substrat-Repressor-Bindung zu einer Konformationsänderung, so dass der Repressor sich von der DNA löst bzw. nicht mehr dort binden kann (Kreuzer *et al.*, 1989; Gärtner *et al.* 1992; Scheler & Hillen, 1994). Das Ergebnis zeigte, dass dieses bestehende Modell über die XylR-vermittelte Regulation des Operons, in dem der Xylose-gebundene Repressor nicht mehr an die DNA bindet, *in vitro* nicht bestätigt werden kann. Durch die Interaktion zwischen His-XylR_{B.meg} mit gebundener Xylose und der Ziel-DNA konnte erstmals gezeigt werden, dass His-XylR_{B.meg} grundsätzlich an die Operatorsequenzen zu binden scheint.

Um einen noch deutlicheren Unterschied in den DNA-Shifts zu erhalten, wurde eine sensitivere Detektionsmethode als die mit Ethidiumbromid gewählt. Dazu wurde die Immunodetektion verwendet, bei der ein Phosphatase-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper an eine zuvor DIG-markierte DNA bindet und das Substrat CDP-Star umsetzt, wodurch eine Chemilumineszenz entsteht. Die Gelretardationsanalysen wurden mit gereinigtem His-XylR_{B.meg} mit und ohne gebundener Xylose erneut durchgeführt. Das PCR-Fragment wurde mit Digoxigenin (DIG) markiert. Bei der für dieses Experiment eingesetzten DNA handelte es sich nun um ein 150 bp-langes PCR Fragment, das die Operatorsequenzen von *xyIR* und *xyIA* enthält sowie wenige folgende Basenpaare am 3'- und 5'- Ende (Position -104 bis +46 in Bezug auf den *xyIA*-Transkriptionsstartpunkt (Abb. 15)). Dieses kürzere DNA-Fragment wurde gewählt, um gegebenenfalls aufgetretene unspezifische Bindungen an die DNA weiter zu minimieren. 5 nM der DIG-markierten DNA, verschiedene Mengen an His-XylR_{B.meg} (125-1000 nM) und Puffer wurden gemischt und bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in einem 6 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, die DNA durch einen Kontaktblot auf eine Membran transferiert und anschließend durch Immunodetektion detektiert.

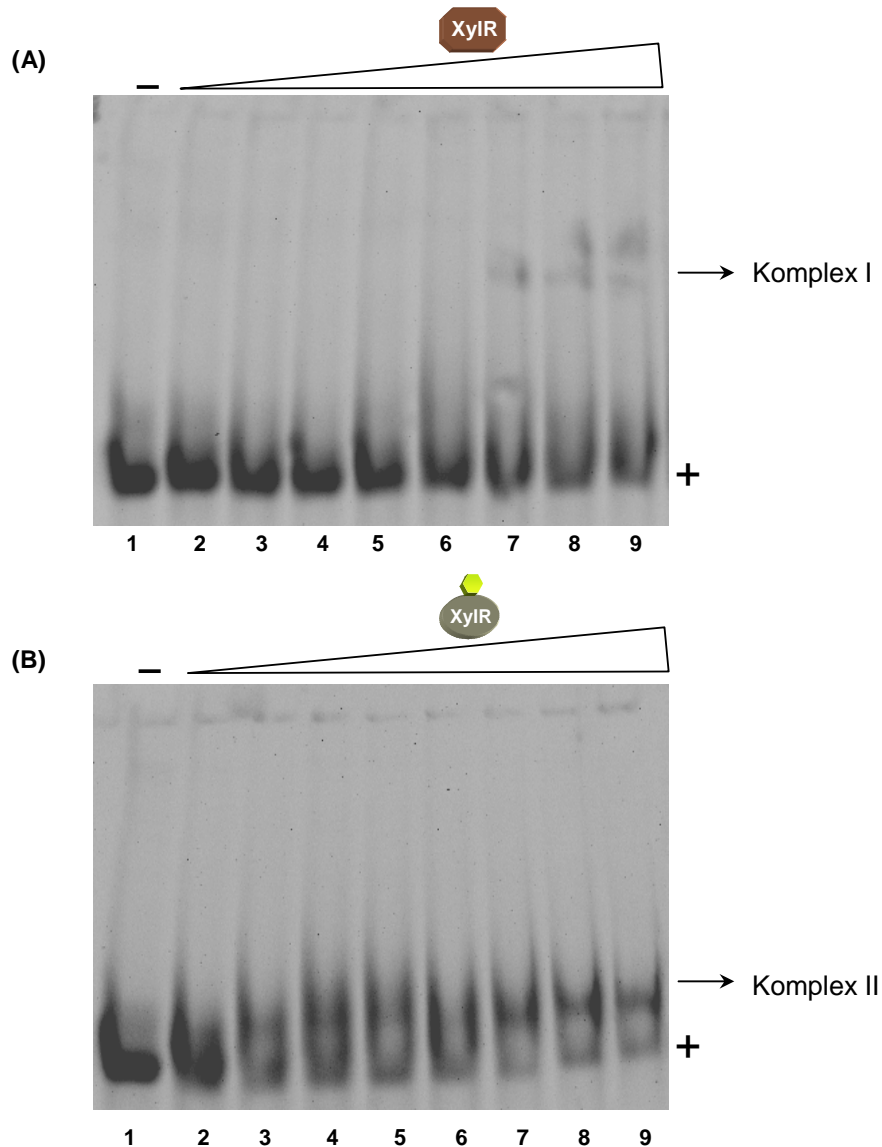


Abb. 17: Gelretardationsanalyse mit gereinigtem His-XylR_{B.meg} (A) ohne und (B) mit gebundener Xylose und der 150 bp-langen DIG-markierten Operatorregion von *xyIR* und *xyIA*. Für die Analyse der DNA-XylR-Interaktion wurde ein markiertes, 150 bp-langes PCR-Fragment (5 nM) verwendet, das die Operator- und Promotorregion von *xyIR* und *xyIA* enthält (Abb. 15). Dieses DNA-Fragment enthält die postulierten Bindesequenzen für XylR und ist mit einem „+“ gekennzeichnet. Das gereinigte His-XylR_{B.meg} wurde in aufsteigenden Mengen (125, 250, 375, 500, 625, 750, 875 und 1000 nM) hinzugegeben und bildet mit der DNA den DNA-Protein-Komplex (A) I und (B) II (schwarzer Pfeil). Die Auftrennung erfolgte in einem 6 %igen Polyacrylamid-Gel. Anschließend erfolgte der Kontaktblot und die Immunodetektion mit Anti-DIG-Antikörpern, die mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt sind und das Substrat CDP-Star umsetzt, wobei eine Chemilumineszenz entsteht. Die Chemilumineszenz wurde durch die Aufnahme mit einer CCD-Kamera visualisiert.

Bahn 1 : kein Protein, nur DNA

Bahn 2-9 : zusätzlich 125, 250, 375, 500, 625, 750, 875 und 1000 nM His-XylR_{B.meg} (A) ohne und (B) mit gebundener Xylose

Auch hier zeigten sich wieder unterschiedliche Laufverhalten der DNA im Gel. Bei der Anwesenheit von His-XylR_{B.meg} ohne Xylose war ein schwacher Shift im Gel zu erkennen und die Ziel-DNA („+“) verlor mit steigender Menge an His-XylR_{B.meg} ohne

gebundene Xylose an Intensität, was auf die Bildung eines DNA-Protein-Komplexes (schwarzer Pfeil, „Komplex I“) hindeutet. Im Vergleich zur ersten Gelretardationsanalyse (Abb. 16 A), bei der die DNA mit Ethidiumbromid gefärbt wurde, führt die sensitivere Methode mittels Immunodetektion zu einem erkennbaren Shift im Gel. Das „Hängenbleiben“ der DNA in den Taschen wurde nicht beobachtet. Dies könnte an der fünffach geringeren Menge an DNA und an den kürzeren DNA-Fragmenten liegen, die das Einlaufen des DNA-Protein-Komplexes erleichtern könnten. Bei beiden Gelretardationsanalysen (Ethidumbromidfärbung und Immunodetektion) trat der Shift (Abb. 17 A) bzw. die Komplexbildung in der Geltasche (Abb. 16 A) ab einer Proteinmenge von 750 nM auf.

Auch im Fall von His-XylR_{B.meg} mit Xylose war erneut ein Shift im Gel zu erkennen (Abb. 17 B). Und auch hier verlor die Ziel-DNA mit steigender Menge an His-XylR_{B.meg} mit gebundener Xylose an Intensität, was auf die Bildung eines DNA-Protein-Komplexes hindeutet. Bei beiden Analysen (Ethidumbromidfärbung und Immunodetektion (Abb. 16 B und Abb. 17 B)) trat der Shift bei einer Proteinmenge von ungefähr 300 nM auf.

Eine Zugabe von unterschiedlichen Mengen an Xylose zur DNA-Protein Bindereaktion führte unter diesen Bedingungen zu keinerlei Veränderungen des DNA-Bindeverhaltens des Repressors. Es wäre zu erwarten gewesen, dass sich unter der zusätzlichen *in vitro* Zugabe von Xylose aus dem DNA-Protein-Komplex I der Komplex II bilden würde (Abb. 17). Möglicherweise war die Bindung von Xylose an den Repressor unter den gewählten Bedingungen nicht möglich, so dass das DNA-Bindeverhalten des Repressors unverändert blieb.

Insgesamt bestätigten die Gelretardationsanalysen zum ersten Mal das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Konformationen der DNA-Protein-Komplexe in Abhängigkeit von An- oder Abwesenheit des Induktors Xylose. Die Komplexe I und II zeigten ein unterschiedliches Shift-Verhalten. Komplex I (ohne Xylose) wanderte nur sehr wenig ins Gel ein, während Komplex II ein schnelleres Laufverhalten zeigte. Die unterschiedlichen Größen der beiden Komplexe weisen auf einen unterschiedlichen Oligomerisierungsgrad hin, was schon während der Analyse über die native PAGE vermutet wurde (Abb. 14). Dies führt nun zu der Annahme, dass der kleinere Komplex II (aus His-XylR_{B.meg} mit gebundener Xylose und DNA) niedriger oligomerisiert ist als der Komplex I (aus His-XylR_{B.meg} ohne gebundene Xylose und DNA).

Aus der Literatur sind bereits Gelretardationsanalysen bekannt, die einen ersten Hinweis auf das DNA-Bindeverhalten des Xylose-Repressors lieferten. Hierbei wurde überproduzierter Xylose-Repressor im Proteinextrakt aus *B. megaterium* verwendet (Dahl *et al.*, 1995). Diese ersten Gelretardationsanalysen zeigten ebenfalls die Bildung von zwei unterschiedlichen DNA-Protein-Komplexen im Gel, allerdings ohne Zuordnung der unterschiedlichen Repressor-Formen (Xylose-gebunden und -ungebunden) (Dahl *et al.*, 1995).

Zusätzlich konnte durch den in dieser Arbeit erfolgreich gereinigten Repressor zum ersten Mal in den Gelretardationsanalysen gezeigt werden, dass für die Repressor-DNA-Bindung keine weiteren Proteine aus dem Zellextrakt notwendig sind.

4.1.7 Modelle für die XylR-vermittelte Regulation des Xylose-Operons

Nachdem durch die Gelretardationsanalysen bestätigt wurde, dass beide Formen des Repressors (mit und ohne gebundene Xylose) an die gleichen Bereiche der DNA binden, sollte nun ein neues Modell zur XylR-vermittelten Regulation des *xyl*-Operons aufgestellt und analysiert werden. Dabei standen zwei mögliche Modelle zur Verfügung, bei denen beide Formen des Repressors an die DNA binden und die Transkription der *xyl*-Gene regulieren. Modell I schlägt vor, dass die unterschiedlichen Formen des Repressors an unterschiedliche Sequenzen binden (Abb. 18).

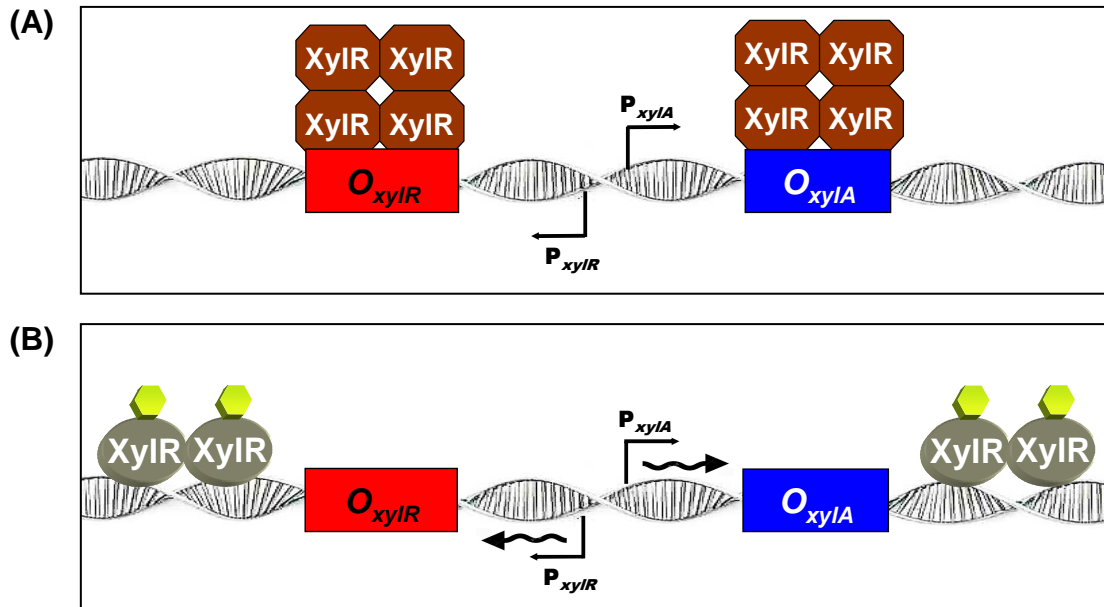


Abb. 18: Schematisches Modell I zur Bindung des (A) Xylose-freien und (B) -gebundenen Repressors an unterschiedliche Sequenzen. Dargestellt ist der intergenische Bereich zwischen *xylA* und *xylR* mit den Operatorsequenzen von *xylR* (O_{xylR} , rote Box) und *xylA* (O_{xylA} , blaue Box) sowie den Promotoren P_{xylR} und P_{xylA} (schwarze Pfeile). **(A)** Nach diesem Modell bindet der Xylose-freie Repressor an die Operatoren von *xylA* und *xylR* und verhindert so die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor, so dass keine Transkription der Gene stattfinden kann. **(B)** Der Xylose-gebundene Repressor bindet nicht direkt an die Operatoren, sondern an eine entfernte, andere Sequenz, so dass die Bindung der RNA-Polymerase nicht beeinträchtigt wird und die Transkription trotz gebundenen Repressors stattfinden kann. Der schwarze, geschwungene Pfeil deutet die Transkription der Gene an. Die Oligomerisierung (4 bzw. 2 Repressormoleküle) ist eine Spekulation, die sich aus den Gelretardationsexperimenten ergeben könnte. Es soll den Unterschied der Oligomerisierung aufzeigen.

Im Modell I bindet der Xylose-freie Repressor (Abb. 18 A) an die postulierten Operatorsequenzen (O_{xylR} , rote Box und O_{xylA} , blaue Box) und verhindert so die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor, so dass keine Transkription der Gene stattfinden kann. Der Xylose-gebundene Repressor (Abb. 18 B) bindet hingegen nicht direkt an die Operatoren, sondern an eine entfernte Sequenz, so dass die Bindung der RNA-Polymerase nicht beeinträchtigt wird und die Transkription der Gene trotz gebundenen Repressors stattfinden kann. Der Operator wurde bisher nur durch Sequenzvergleiche postuliert, aber noch nicht *in vitro* als tatsächlicher Operator für *B. megaterium* identifiziert (Kreuzer *et al.*, 1989; Scheler *et al.*, 1991), so dass eine weitere Bindestelle für XylR möglich sein könnte.

Die unterschiedlichen Oligomerisierungen der beiden Repressor-Formen, die mittels Gelretardationsstudien ermittelt wurden, werden in der schematischen Darstellung durch ein Tetramer und ein Dimer angedeutet und stehen lediglich für eine höhere Oligomerisierung des Xylose-ungebundenen und eine niedrigere Oligomerisierung des Xylose-gebundenen Repressors.

Ein zweites Modell II schlägt vor, dass die unterschiedlichen Formen des Repressors an die gleiche DNA-Sequenz binden (Abb. 19).

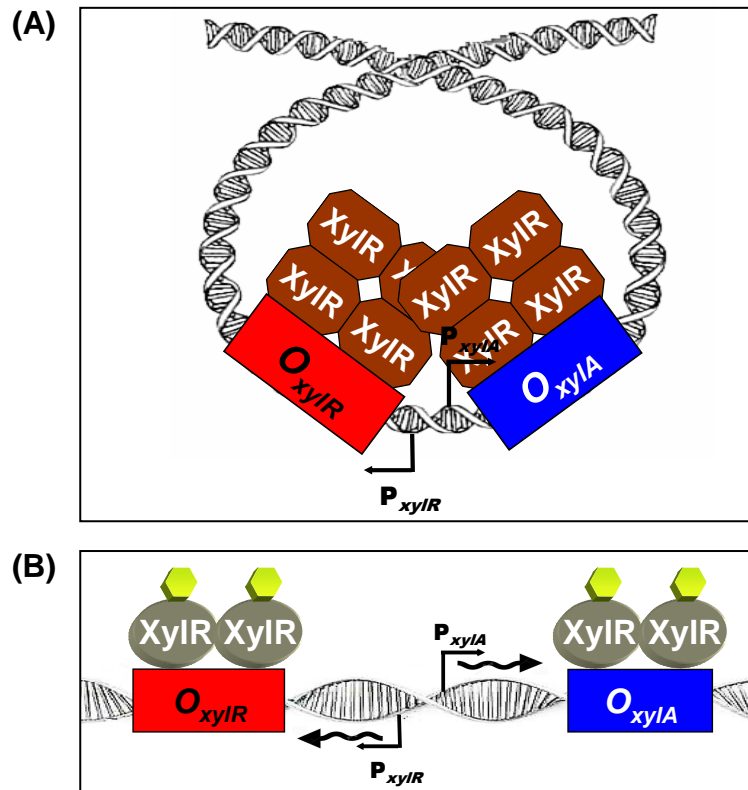


Abb. 19: Schematisches Modell II zur Bindung des (A) Xylose-freien und (B) -gebundenen Repressors an die gleiche DNA-Sequenz. Dargestellt ist der intergenische Bereich zwischen *xylA* und *xylR* mit den Operatorsequenzen von *xylR* (O_{xyIR}, rote Box) und *xylA* (O_{xyIA}, blaue Box) sowie den Promotoren P_{xyIR} und P_{xyIA} (schwarze Pfeile). **(A)** Nach diesem Modell bindet der Xylose-freie Repressor an die Operatorsequenzen und verhindert durch eine besondere DNA-Organisation (z. B. Loopstruktur) die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor, so dass keine Transkription der Gene stattfinden kann. **(B)** Der Xylose-gebundene Repressor bindet ebenfalls an die Operatorsequenzen von *xylR* und *xylA* und verhindert in Anwesenheit von Xylose die Loopstruktur der DNA, so dass die Transkription trotz gebundenen Repressors stattfinden kann. Der schwarze, geschwungene Pfeil deutet die Transkription der Gene an. Die dargestellte Oligomerisierung (4 bzw. 2 Repressormoleküle) ist eine Spekulation und soll den Unterschied der Oligomerisierung deutlich machen.

Der Xylose-freie Repressor (Abb. 19 A) bindet in Abwesenheit von Xylose in höher oligomerisierter Form als der Xylose-gebundene Repressor an die Operatorsequenzen, was zu einer besonderen DNA-Organisation, z.B. DNA-Loopstruktur, führen könnte. Diese DNA-Struktur könnte die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor verhindern, so dass keine Transkription der Gene stattfinden kann. Die Anwesenheit von Xylose (Abb. 19 B) würde die Bildung einer niedrigeren oligomerisierten Form als Xylose-freier Repressor bewirken, so dass es zu einer Auflösung der Loopstruktur kommen kann und die Gene trotz gebundenen Repressors transkribiert werden können. Da beide Repressor-Formen nach diesem

Modell an die gleiche Operatorsequenz binden, ist eine unterschiedliche DNA-Organisation, die die Transkription der Gene verhindert oder zulässt, wahrscheinlich. Modell II wird auch durch bereits bekannte Literaturhinweise gestützt. 1994 wurde die Bindung von zwei unterschiedlich oligomerisierten Formen des Xylose-Repressors aus *B. licheniformis* an die gleiche Operatorsequenz bereits beschrieben. Hierbei wurden allerdings noch nicht die unterschiedlich oligomerisierten Formen in Abhängigkeit des Induktors Xylose zugeordnet (Scheler & Hillen, 1994). Außerdem konnte durch bereits bekannte Studien über den Lac-Repressor gezeigt werden, dass DNA-gebundene Dimere die Transkription der Gene nicht verhindern, da sie die Bildung des RNA-Polymerase-Initiationskomplexes mit der DNA nicht beeinflussen (Straney & Crothers, 1987). Dass der gebundene Xylose-Repressor möglicherweise nicht zu einer sterischen Behinderung der RNA-Polymerase-DNA-Bindung führen könnte, wird durch den 7 bp-Abstand des *xyIA*-Promotors (-10 Box) zum Operator im Xylose-Operon unterstützt (Rygus *et al.*, 1991).

Um die DNA-Bindestellen der unterschiedlichen Repressor-Formen zu identifizieren und somit eines der beiden Modelle weiter zu stützen, wurden nachfolgend DNaseI-Footprint-Analysen durchgeführt.

4.1.8 *In vitro* Bindestudien mit gereinigtem His-XylR_{B.meg} mittels DNaseI-Footprint-Analysen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass beide Formen des Xylose-Repressors (mit und ohne gebundene Xylose) an die DNA binden können, sollte nun mittels DNaseI-Footprint-Analysen untersucht werden, ob beide Repressor-Formen an gleiche oder an unterschiedliche DNA-Sequenzen binden. Ein DNaseI-Footprint ist ein Verfahren, um Proteinbindestellen an der DNA zu bestimmen. Bei dieser Methode wird DNA mit Protein inkubiert und dann das DNA-Fragment enzymatisch mit DNaseI gespalten, wobei die Stellen, an denen ein Protein bindet, vor dem enzymatischen Verdau geschützt sind. Nach dem Verdau entstehen DNA-Fragmente verschiedener Länge, die in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und detektiert werden. Bindet ein Protein an die DNA und schützt diese vor dem Verdau, fehlen DNA-Fragmente bestimmter Länge, was durch eine Lücke („footprint“) im Polyacrylamidgel sichtbar wird.

Für die DNaseI-Footprint-Analyse wurde ein 225 bp-langes DIG-markiertes PCR Fragment verwendet, das der intergenischen Region von *xyIR* und *xyIA* (Position

-137 bis +89 in Bezug auf den *xyIA*-Transkriptionsstartpunkt (Abb. 15)) entspricht. Die intergenische Region beinhaltet die Operatorsequenz von *xyIA* und *xyIR*, die als mögliche Bindestelle für XylR dienen soll. Für den Assay wurden unterschiedliche Konzentrationen des frisch gereinigten Repressors mit und ohne gebundener Xylose (250 nM, 500 nM und 1000 nM) und 12 nM DIG-markiertes DNA-Fragment bei RT inkubiert. Nach der Fragmentierung durch DNaseI wurden die entstandenen DNA-Fragmente in einem denaturierenden Acrylamid-Harnstoffgel elektrophoretisch aufgetrennt. Zusätzlich wurde eine Sequenzierreaktion der intergenischen Region von *xyIA* und *xyIR* auf das Gel aufgetragen, um die Basensequenz der Proteinbindestelle ermitteln zu können. Die Footprint-Analysen wurden sowohl mit dem codierenden als auch mit dem nicht-codierenden Strang durchgeführt. Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte der Kontaktblot und die Immunodetektion mit Anti-DIG-Antikörpern.

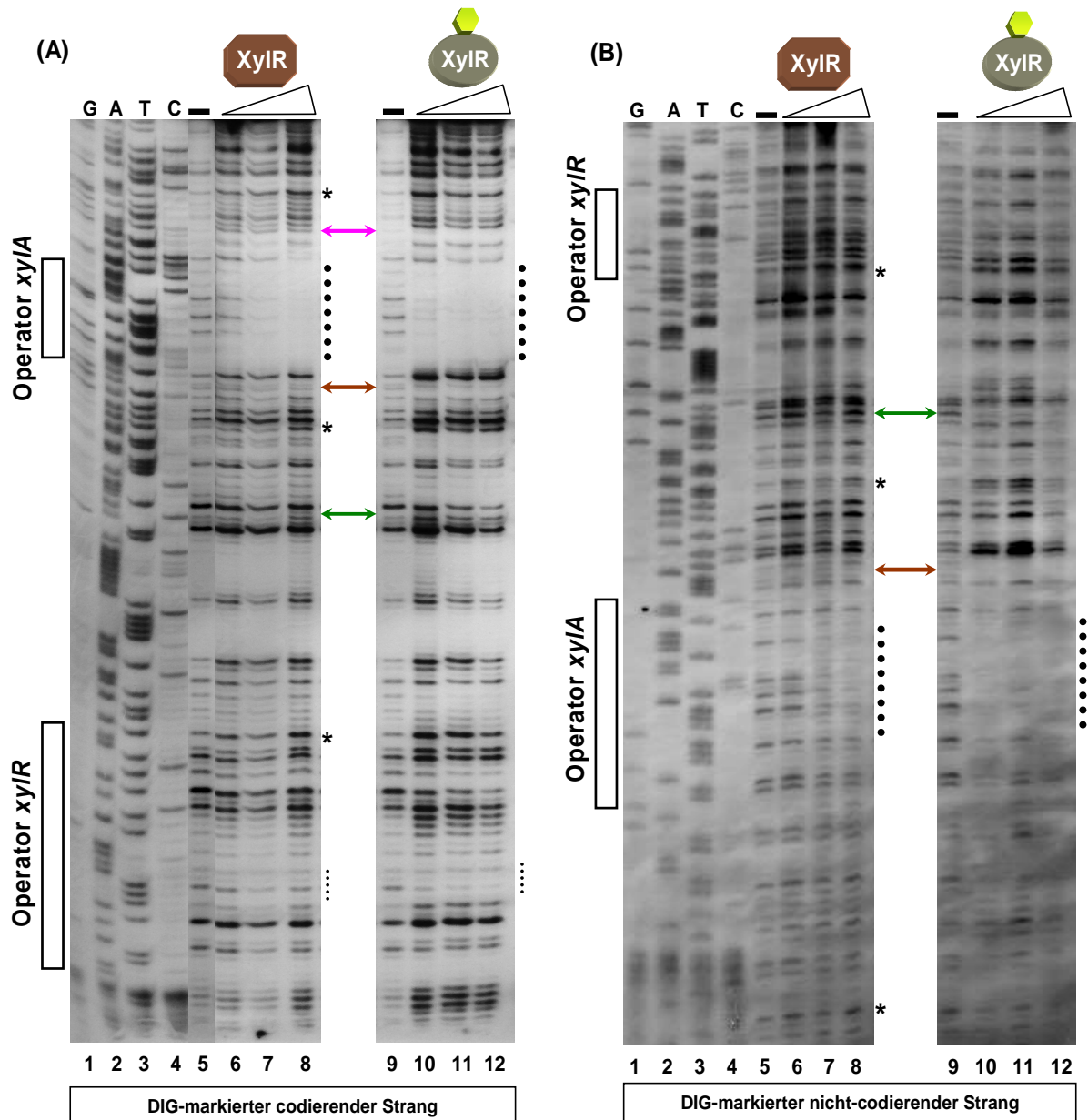


Abb. 20: DNaseI-Footprint-Analyse mit gereinigtem His-XylR_{B.meg} mit und ohne gebundener Xylose und dem (A) codierenden sowie (B) nicht-codierenden DNA-Strang der intergenischen Region von *xylR* und *xylA*. Für die DNaseI-Footprint-Analysen wurden 12 nM DIG-markiertes DNA-Fragment der intergenischen Region zwischen *xylR* und *xylA* ohne (-) und mit 250, 500 und 1000 nM gereinigtem His-XylR_{B.meg} inkubiert. Nach der Inkubation und dem DNaseI-Verdau wurden die Ansätze und die Sequenzierreaktion (G, A, T, C) in einem denaturierenden Acrylamid-Harnstoffgel elektrophoretisch getrennt. Anschließend erfolgte der Kontaktblot, die Immunodetektion und das Auflegen eines Röntgenfilms. Die potenziellen Binderegionen sind mit weißen Boxen (Operator von *xylR* und *xylA*), die protektierten DNA-Bereiche („Footprints“) durch gepunktete Linien und die hypersensitiven Stellen durch Sterne gekennzeichnet. Unterschiedliche DNA-Schnittmuster, die in Abhängigkeit der verwendeten Repressor-Form (Xylose-gebunden oder -ungebunden) auftreten, sind mit bunten Pfeilen gekennzeichnet.

Bahn 1-4 : Sequenzierreaktion G, A, T, C

Bahn 5 : kein Protein, nur DNaseI-verdaute DNA

Bahn 6-8 : 250, 500 und 1000 nM His-XylR_{B.meg} ohne gebundene Xylose und DNA

Bahn 9 : kein Protein, nur DNaseI-verdaute DNA

Bahn 10-12: 250, 500 und 1000 nM His-XylR_{B.meg} mit gebundener Xylose und DNA

Nach der Inkubation der DNA mit His-XylR_{B.meg} ohne bzw. mit Xylose war ein deutlicher Footprint im Bereich des *xylA*-Operators für beide Repressor-Formen zu erkennen (Abb. 20 A, Punkte). Dieser Footprint entsteht durch die Bindung des Xylose-Repressors an den *xylA*-Operator, der daraufhin vor der Spaltung mit DNaseI geschützt ist. DNA-Fragmente, die durch den DNaseI-Verdau des *xylA*-Operators entstehen, fehlen daher an dieser Stelle. Im Vergleich dazu sind die entsprechenden Fragmente der verdauten DNA, die ohne Protein inkubiert wurden, deutlich zu erkennen, da hier kein Schutz durch Proteine stattfand. Der Footprint wird mit steigender Proteinkonzentration immer deutlicher, was ein Hinweis auf eine spezifische Bindung ist. Im Bereich des *xylR*-Operators ist ein sehr schwacher Footprint zu erkennen (Abb. 20 A, kleine Punkte). Bei Anwesenheit von His-XylR_{B.meg} wurden dort die Banden lediglich etwas schwächer im Vergleich zur Kontroll-DNA ohne His-XylR_{B.meg}. Ein schwach ausgeprägter Footprint kommt durch eine schlechtere Bindung des Repressor an die Operatorregion zustande, so dass noch eine größere Menge an freier DNA vorliegt, die nicht vor einem DNase-Verdau geschützt ist. Möglicherweise könnte das verwendete DNA-Fragment zu kurz sein, so dass eine optimale Bindung zwischen Protein und DNA *in vitro* nicht möglich ist. Außerdem könnten die ausgewählten Reaktionsbedingungen für die DNA-Protein Bindung wie Temperatur, Inkubationsdauer und Puffer für einen schwachen Footprint verantwortlich sein. Bedingungen aus der Literatur für eine *in vitro* Bindung dieser postulierten *xylR*-Operatorregion durch den Xylose-Repressor sind weder für *B. megaterium* noch für andere *Bacillus* sp. bekannt.

Das Schnittmuster der verdauten DNA, die mit His-XylR_{B.meg} ohne gebundene Xylose inkubiert wurde, zeigt an den gekennzeichneten Stellen (*) DNA-Banden, die mit steigender Proteinkonzentration immer intensiver bzw. dicker werden (Abb. 20, Bahn 8). Diese Stellen werden als hypersensitive Stellen („hypersensitive sites“) bezeichnet und weisen auf eine Art Biegung der DNA hin. Gebogene DNA ist für die DNaseI leichter zugänglich und führt daher an diesen Stellen zu einem stärkeren Verdau, was sich in den intensiveren DNA-Fragmenten widerspiegelt. Die bunten Pfeile in Abb. 20 deuten auf unterschiedliche Schnittmuster in Abhängigkeit der verwendeten His-XylR_{B.meg}-Form (mit oder ohne Xylose) hin. Der pinke Pfeil zeigt, dass sich an dieser Stelle die Banden der aufgetrennten DNA in Abhängigkeit des verwendeten Repressors (mit oder ohne Xylose) unterscheiden, wobei ohne Xylose eine DNA-Bande zu erkennen ist, die bei Anwesenheit von Xylose fehlt. Ebenso zeigt

der braune und grüne Pfeil, dass bei der aufgetrennten DNA, die mit Xylose-freiem Repressor inkubiert wurde, eine weitere DNA-Bande im Vergleich zur DNA, die mit Xylose-gebundenem Repressor inkubiert wurde, auftrat. Diese unterschiedlichen Schnittmuster sind ein deutlicher Hinweis darauf, dass die DNA in Abhängigkeit der Repressor-Form (mit oder ohne Xylose) unterschiedlich organisiert zu sein scheint. Eine unterschiedliche DNA-Organisation führt dazu, dass der DNaseI-Verdau erleichtert oder erschwert wird und dadurch unterschiedliche DNA-Bande nach dem Verdau entstehen.

Die Footprints im *xylA*-Operator, die hypersensitiven Stellen und die unterschiedlichen Schnittmuster treten ebenfalls am DIG-markierten nicht-codierenden Strang (Abb. 20 B) auf und bestätigen die Ergebnisse der Footprint-Analysen mit dem DIG-markierten codierenden Strang. Lediglich das durch den pinken Pfeil gekennzeichnete unterschiedliche Schnittmuster im codierenden Strang fehlte im nicht-codierenden Strang, da dieser Bereich aus sehr kurzen DNA-Fragmenten besteht, die zum Teil aus dem Gel gelaufen sind oder sehr schwach detektiert wurden (Abb. 20 B). Mit Hilfe der Sequenzierreaktion konnten die durch den Repressor protektierten Bereiche („footprints“), hypersensitiven Stellen und die Bereiche mit unterschiedlichen DNA-Schnittmustern (bunte Pfeile) identifiziert werden. Es wird deutlich, dass sich die meisten identifizierten Merkmale sowohl auf dem codierenden als auch auf dem nicht-codierenden Strang wieder finden (Abb. 21).

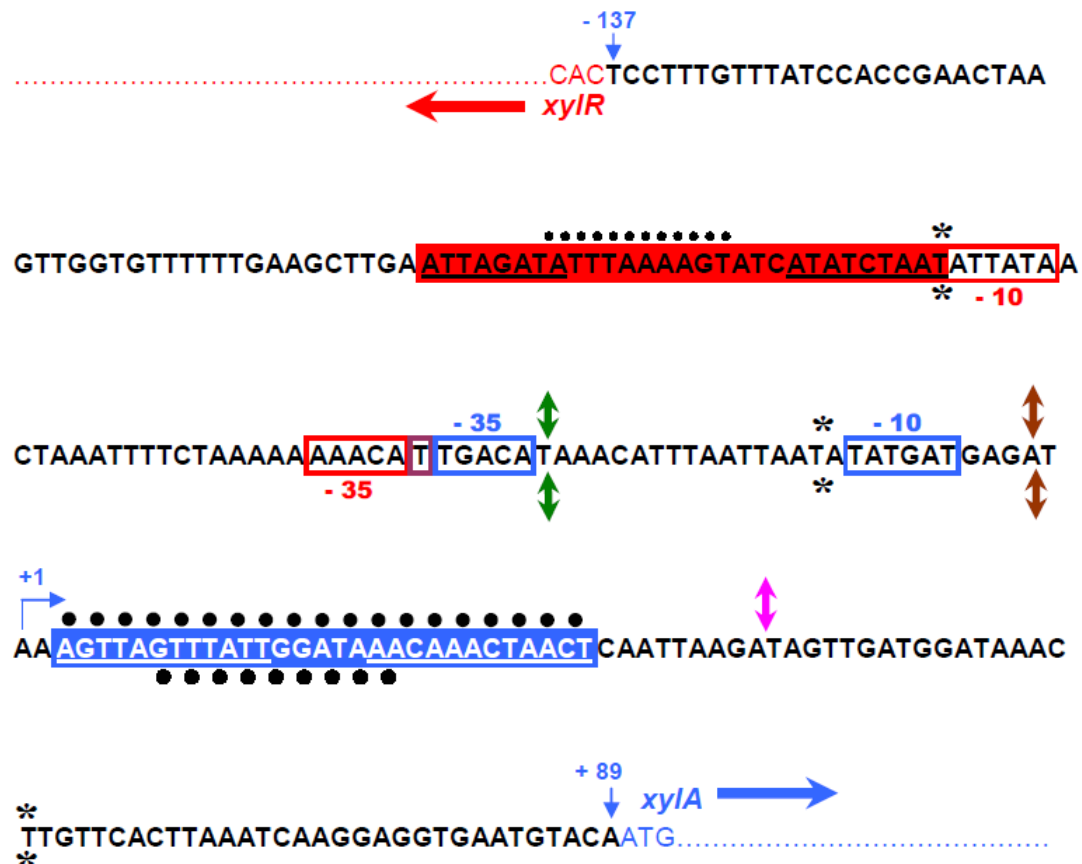


Abb. 21: Sequenz der eingesetzten DNA für die Footprintanalyse von Position -137 bis +89 in Bezug auf den *xylA*-Transkriptionsstartpunkt. Dargestellt ist die 225 bp-lange Sequenz der intergenischen Region zwischen *xylA* (blaue Elemente) und *xylR* (rote Elemente), die für die Footprintanalyse eingesetzt wurde. Die palindromischen Sequenzen im Operator sind jeweils unterstrichen. Der Transkriptionsstartpunkt von *xylA* ist durch einen Pfeil und die Beschriftung „+1“ markiert. Die Punkte (.....) zeigen die von XylR protektierte Operatorregionen („Footprints“), die Sterne (*) markieren die hypersensitiven Stellen und die bunten Pfeile (↕) zeigen Bereiche der Footprintanalyse mit unterschiedlichen DNA-Schnittmustern in Abhängigkeit der eingesetzten Repressor-Form (mit oder ohne Xylose). Symbole über der Sequenz beziehen sich auf den codierenden, Symbole unter der Sequenz auf den nicht-codierenden Strang.

Die *in vitro* Studien zeigen, dass die Footprints der unterschiedlichen Repressor-Formen beide im *xylA*-Operator auftreten, woraus sich schließen lässt, dass der Xylose-Repressor mit und ohne gebundene Xylose an die gleiche Sequenz bindet. Die hypersensitiven Stellen deuten darauf hin, dass es durch die DNA-Bindung des Xylose-freien Repressors zu einer Biegung der DNA kommt. Die unterschiedlichen DNA-Schnittmuster in der Footprint-Analyse, die in Abhängigkeit der eingesetzten Repressor-Form entstehen, weisen darauf hin, dass die gebundene DNA abhängig von der Repressor-Form organisiert sein muss. Die bisherige Vorstellung über die XylR-vermittelte Regulation des *xyl*-Operons, in der von einem DNA-ungebundenen Repressor in Anwesenheit und einem DNA-gebundenen Repressor in Abwesenheit von Xylose ausgegangen wird, kann mit den hier gezeigten *in vitro* Studien nach dem in dieser Arbeit postulierten Modell II (Abb. 19) für *B. megaterium* angepasst werden.

Eine Transkription der betroffenen Gene trotz eines DNA-gebundenen Repressors zeigte auch eine Studie mit einem mutierten Lac-Repressor in *E. coli*, der durch die Mutation nur noch zu Dimeren oligomerisieren konnte. Dort konnte gezeigt werden, dass DNA-gebundene Lac-Dimere die Transkription der Gene nicht verhindern, da sie die Bildung des RNA-Polymerase Initiationskomplexes mit der DNA nicht beeinflussten (Straney & Crothers, 1987).

Außerdem konnte durch die Footprint-Analysen erstmals in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der postulierte *xyIA*-Operator für *B. megaterium* auch als tatsächliche Bindestelle für XylR dient und dass der Repressor in Abhängigkeit von Xylose unterschiedlich oligomerisiert sein muss.

4.2 Untersuchungen zur phänotypischen Heterogenität während der rekombinanten Gfp-Produktion in *Bacillus megaterium*

Phänotypische Heterogenität in *B. megaterium* wurde bereits 2007 während der rekombinanten Produktion von Gfp nach einer Bioreaktor-Kultivierung beobachtet. Das Gfp diente hierbei als Modellprotein, um das Xylose-induzierbare Expressionssystem zu etablieren und zu testen (Kapitel 1.4). Eine FACS-Analyse ergab, dass 70 % der *B. megaterium*-Zellen stark fluoreszierten und demnach viel Gfp produzierten, während die restlichen 30 % nicht oder sehr schwach fluoreszierten und demnach sehr wenig oder kein Gfp produziert wurde (Biedendieck *et al.*, 2007 b). Phänotypische Heterogenität von *B. megaterium* zeigte sich auch in den ersten Analysen zu dieser Arbeit. Nach Ausplattierung einer verdünnten Schüttelkolben-Kultur auf Xylose-haltigen Agar-Platten entstanden viele (~80 %) grün fluoreszierende und einige wenige (~20 %) weiße nicht-fluoreszierende Kolonien (Abb. 22 A). Auch die Untersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie zeigte Gfp-produzierende *B. megaterium* Stäbchenketten mit stark und kaum fluoreszierenden Zellen (Abb. 22 B).

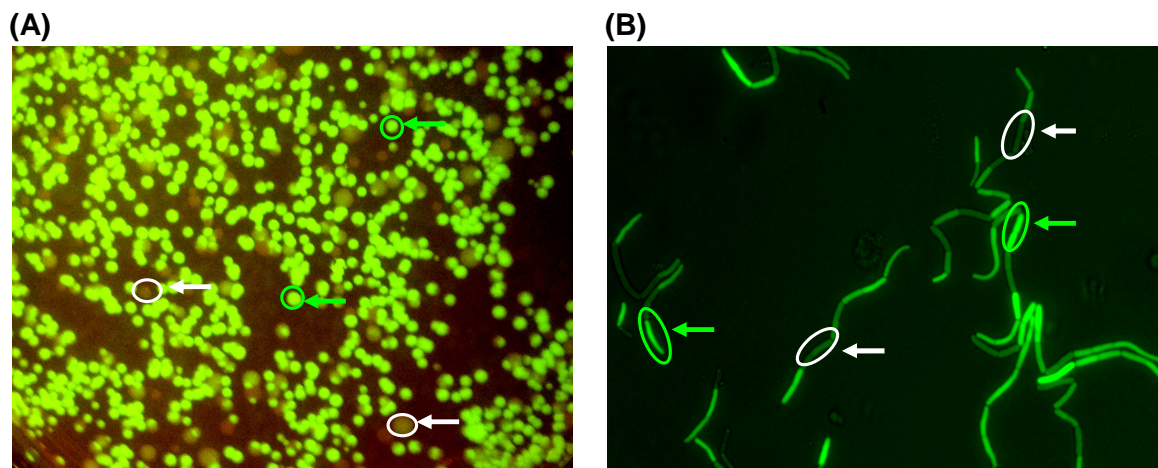


Abb. 22: Gfp-produzierender *B. megaterium* DSM319 transformiert mit pSSBm85. Das Plasmid-basierte *gfp*-Gen befindet sich unter der Kontrolle des optimierten Xylose-induzierbaren Promotors P_{xyIA}^{opt} . **(A)** Die ausplattierte Flüssigkultur des *B. megaterium*-Plasmidstamms zeigte auf Xylose-haltigen Agar-Platten grün fluoreszierende Kolonien (grüne Kreise und Pfeile) und einige wenige nicht-fluoreszierende Kolonien (weiße Kreise und Pfeile). **(B)** Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (630-fach vergrößert) des *B. megaterium*-Plasmidstamms zeigten Stäbchenketten, deren Zellen stark und kaum fluoreszierten (grüne bzw. weiße Kennzeichnung).

Durch vorherige Versuche wurde ausgeschlossen, dass die weißen nicht-fluoreszierenden Zellen durch Mutation oder Plasmidverlust entstanden waren. Diese weißen Kolonien zeigten, dass sich bei erneuter Kultivierung wieder die Aufspaltung von stark und kaum fluoreszierenden Zellen einstellte, was ebenfalls Mutationen und

Plasmidverlust ausschließen ließ. Außerdem zeigten die weißen nicht-fluoreszierenden Zellen während Time lapse-Aufnahmen unter dem Mikroskop besseres Wachstum als die starken Gfp-Produzierer, wodurch eine Art Ruhestadium ausgeschlossen werden konnte. Demnach wurde auch vermutet, dass die weiß erscheinenden Zellen noch eine geringe Menge an Gfp produzieren konnten, die jedoch nicht mehr detektiert wurde. Die Untersuchung der phänotypischen Heterogenität kann aus industrieller und wirtschaftlicher Sicht von Bedeutung sein, da die Nicht-Produzierer zwar das Nährstoffangebot verbrauchen, aber kein Protein produzieren und somit eine Last für den gesamten Prozess darstellen. Die Aufhebung der Heterogenität könnte so zu einer Produktionssteigerung führen.

In der Literatur sind verschiedene Ursachen für die phänotypische Heterogenität bekannt (Kapitel 1.5.1), die auch in dieser Arbeit als Grundlage und Arbeitsmodell für die Untersuchung der phänotypischen Heterogenität herangezogen werden. Um neue Erkenntnisse über die Ursache der phänotypischen Heterogenität in *B. megaterium* zu gewinnen, werden (1) eine autokatalytische Genexpression des Xylose-Transporters (Kapitel 1.5.1.1), (2) ein mögliches Repressor-Induktor Ungleichgewicht durch high-copy Plasmide und (3) eine mögliche ungleiche Verteilung von Zellkomponenten während der Zellteilung (Kapitel 1.5.1.2) als Arbeitsmodell aufgestellt und untersucht (Abb. 23). Die Ermittlung der Ursachen der phänotypischen Heterogenität liefern zukünftige Arbeitsansätze, um die phänotypische Kulturheterogenität zu verstehen und aufzuheben, um letztendlich die Proteinproduktion möglicherweise steigern zu können.

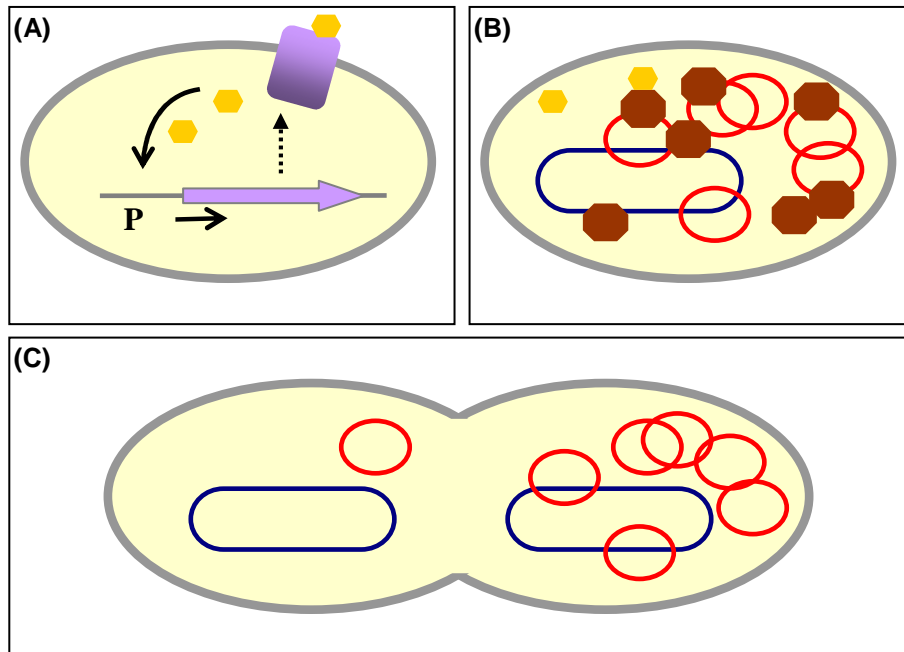


Abb. 23: Schematische Übersicht über die möglichen Ursachen für phänotypische Heterogenität während der heterologen Gfp-Produktion des *B. megaterium*-Plasmidstamms DSM319 transformiert mit pSSBm85. Das bakterielle Genom ist in blau, die Plasmide in rot, der Xylose-Transporter in violett, die Xylose-Repressoren in braun und der Induktor Xylose in gelb dargestellt. **(A)** Eine autokatalytische Genexpression des Transporters, **(B)** ein Repressor-Induktor Ungleichgewicht durch high-copy Plasmide und **(C)** eine ungleiche Verteilung von Zellkomponenten auf die Tochterzellen während der Zellteilung können mögliche Ursachen für die phänotypische Heterogenität in *B. megaterium* darstellen.

4.2.1 Autokatalytische *xylT*-Expression im Xylose-Operon als Ursache für phänotypische Heterogenität

Die autokatalytische Genexpression eines Transporters stellt eine häufige Ursache für phänotypische Heterogenität dar (Novick & Weiner, 1957) und kommt auch im Xylose-Operon von *B. megaterium* vor. Sie tritt immer dann auf, wenn das Gen, das für den Transporter eines Induktors codiert, durch diesen Induktor selbst transkriptionell kontrolliert wird (Khlebnikov *et al.*, 2000). Dabei kann es sich beispielsweise um einen Zucker-Transporter (Xylose-Permease) handeln, der einen bestimmten Zucker (Xylose als Induktor) in die Zelle transportiert und nur in Anwesenheit dieses Zuckers exprimiert wird. Der Transporter wirkt sich also positiv auf seine eigene Synthese aus.

Zellen einer Population besitzen auch vor der Induktion Zucker-Transporter in ihrer Membran, deren Menge durch zufälliges Rauschen in der Genexpression variiert (Kapitel 1.5.1.1). Bei Zugabe des Induktors gelangt dieser zunächst in die Zellen, die zufällig eine größere Menge des Transporters enthalten. Bei einer ausreichenden intrazellulären Menge des Induktors bindet dieser an den Repressor, der daraufhin

inaktiviert wird. Durch die Inaktivierung des Repressor werden das Transportergen und andere assoziierte Gene exprimiert. Der Transporter fördert wiederum die Aufnahme des Induktors, was zu einer noch stärkeren Synthese des Transporters führen kann. Dies hat auch Auswirkungen auf die Tochterzellen, die ebenfalls nach der Zellteilung eine ausreichende Menge des Transporters in ihrer Membran besitzen, so dass der Induktor akkumulieren kann und die Gene des Transporters und andere assoziierte Gene folglich transkribiert werden. Dieser Teil der Population stellt den „induzierten Phänotyp“ dar.

Ist die Menge des Transporters in der Membran vor der Induktion sehr gering, kann sich der Induktor nicht ausreichend in der Zelle akkumulieren, um den Repressor zu inaktivieren. Das Transportergen wird nicht oder weiterhin wenig transkribiert, so dass in den ohnehin schon Transporter-armen Zellen keine weiteren Transporter synthetisiert werden. Der Transporter unterliegt außerdem durch die Zellteilung einer Art Verdünnungseffekt, wodurch der Induktor immer schlechter in die Zelle gelangt. Dieser Teil der Population wird als „nicht-induzierter Phänotyp“ bezeichnet (Siegele & Hu, 1997; Khlebnikov *et al.*, 2000).

Die autokatalytische Genexpression eines Transporters begünstigt das Vorhandensein von unterschiedlichen Mengen des Transporters in der Membran zwischen den einzelnen Zellen. Durch unterschiedliche Transporter-Mengen in der Zellmembran von *B. megaterium* können unterschiedliche Menge an Xylose in die Zelle transportiert werden, was sich auch auf das rekombinante Xylose-induzierbare Expressionssystem auswirken kann, in dem der Xylose-induzierbare Promotor, unter dessen Kontrolle das *gfp*-Gen liegt, unterschiedlich in den Zellen induziert wird. Dies kann zu heterogenen Phänotypen während der rekombinanten Gfp-Produktion in *B. megaterium* führen. Das Auftreten phänotypischer Heterogenität durch die autokatalytische Genexpression eines Transporters und deren Abhängigkeit von der Transportermenge in der Membran wurde bereits für den Laktose (LacY)- (Novick & Weiner, 1957; Mitrophanov & Groisman, 2008; Narang & Pilyugin, 2008) und den Arabinose-Transporter (AraE) (Siegele & Hu, 1997; Khlebnikov *et al.*, 2000) in *E. coli* gezeigt, deren Aufbau und Funktion ähnlich zum Xylose-Operon aus *B. megaterium* sind (Kapitel 1.2.1). Daher wurde auch in dieser Arbeit die Untersuchung der autokatalytischen Genexpression des Xylose-Transporters als mögliche Ursache für phänotypische Heterogenität durchgeführt. Hierfür sollte der Einfluss einer ausgeschalteten autokatalytischen Genexpression des Transporters und die

Verteilung des Xylose-Transporters auf der Oberfläche von nicht- und fluoreszierenden Zellen analysiert werden.

4.2.1.1 Analyse und Einfluss von Systemen ohne autokatalytische Genexpression des Transporters mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

Für die Analyse des Einflusses der autokatalytischen Genexpression des Xylose-Transporters wurden zwei Ansätze gewählt, die die autokatalytische Genexpression entkoppeln sollen. Aus der Literatur sind bereits Strategien bekannt (Khlebnikov *et al.*, 2000). Hierzu zählen Promotoren von Transportern, die unabhängig von dem Induktor, der über diese transportiert wird, kontrolliert werden, und Transporter-defiziente Stämme, die mit einem Induktor-Analog induziert werden, das durch die Zellmembran diffundieren kann (Khlebnikov *et al.*, 2000).

Für die Umsetzung der Strategien wurde zum einen ein Expressionssystem mit einem konstitutiven Promotor (pRBBm258) in *B. megaterium* DSM319 verwendet, der für die rekombinante Gfp-Produktion nicht mehr mit Xylose induziert werden musste. Kultivierungen im BioLector ergaben zu Beginn (0 h nach Inokulation) eine 7-fach höhere Gfp-Produktion im Vergleich zum nicht-induzierten Referenzstamm. Außerdem wurden etwa 91,2 % an maximaler relativer Fluoreszenz pro Zelle im Vergleich zum Referenzstamm DSM319 transformiert mit pSSBm85 erreicht (Abb. 37, im Anhang). Der konstitutive Promotor stammt ursprünglich aus *B. megaterium* DSM319, wo er das Pyruvat-Dehydrogenase-Gen (*pdh*) kontrolliert.

Zum anderen wurde eine *B. megaterium* *xylT*-Mutante WH377 (Schmiedel *et al.*, 1997) transformiert mit pSSBm85 verwendet, die defizient in einer funktionsfähigen Xylose-Permease ist, so dass das System unabhängig vom Xylose-Transporter war. Analysen im BioLector von *B. megaterium* WH377 transformiert mit pSSBm85 zeigten indirekt, dass der Induktor Xylose auch über andere unbekannte Systeme in die Zelle transportiert zu werden scheint, da auch ohne Transporter eine Induktion der Gfp-Produktion in Anwesenheit von Xylose stattfand (Abb. 37, im Anhang). Für *E. coli* ist bekannt, dass durch Laktose-Permease (LacY)-defiziente Stämme aus zuvor heterogenen homogene Phänotypen hervorgerufen werden (Herzenberg, 1959; Maloney & Rotman, 1973). Später wurde gezeigt, dass *E. coli*-Stämme, bei denen die autokatalytische Genexpression des Arabinose-Transporters entkoppelt

wurde, ebenfalls homogene Phänotypen zeigten (Khlebnikov *et al.*, 2000; Morgan-Kiss *et al.*, 2002).

Um die Ursache für phänotypische Heterogenität zu analysieren, wird im Folgenden und auch in den nächsten Kapiteln die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie nach Kapitel 3.6.2 verwendet. Mit Hilfe der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie kann die Verteilung von fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zellen für jeden zu untersuchenden Stamm ermittelt werden und mit dem heterogenen Stamm DSM319 transformiert mit pSSBm85 ($P_{xyIA}^{opt.}-gfp$), der hier als Referenzstamm herangezogen wird, verglichen werden. In DSM319 transformiert mit pSSBm85 wurde das heterogene Verhalten gezeigt (Münch *et al.*, 2015). Mit der Methode der Durchflusszytometrie können verschiedene Stämme schnell und gleichzeitig auf Einzelzellebene untersucht werden und so mögliche Ursachen gefunden werden, die die phänotypische Heterogenität beeinflussen. Da die Durchflusszytometrie keinerlei Anhaltspunkte über die Mengen an rekombinant produziertem Gfp geben kann, werden alle Stämme außerdem im BioLector im Hinblick auf Wachstum und Gfp-Produktion analysiert. Dies erlaubt parallelisierte Ansätze unter gleichbleibenden Bedingungen (www.m2p-labs.com).

Für die Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden jeweils 50 mL einer A5+4-ü.N.-Kultur mit DSM319 transformiert mit pMM1520 (Leervektor), DSM319 transformiert mit pSSBm85 ($P_{xyIA}^{opt.}-gfp$), DSM319 transformiert mit pRBBm258 ($P_{konstitutiv}-gfp$) und WH377 ($\Delta xyIT$) transformiert mit pSSBm85 ($P_{xyIA}^{opt.}-gfp$) kultiviert. Darauf folgend wurden jeweils 100 mL einer A5+4-Hauptkultur 1:100 angeimpft, die bis zu einer $OD_{578\text{ nm}}$ von 0,3 inkubiert wurde. Aus diesen Hauptkulturen wurden pro Stamm 2 mL Medium auf eine $OD_{578\text{ nm}}$ von 0,005 eingestellt und direkt im Durchflusszytometer vermessen (0 h, Abb. 24). Die Kulturen wurden mit 0,5 % (w/v) Xylose induziert (außer DSM319 transformiert mit pRBBm258) und weiter inkubiert. Zwei, vier, sechs und acht Stunden nach Induktion erfolgte die Probennahme. Als Referenz für nicht-fluoreszierende Zellen diente der *B. megaterium* DSM319 transformiert mit pMM1520, der einen Leervektor (ohne *gfp*) enthielt. Als Referenzstamm für heterogene Phänotypen diente *B. megaterium* DSM319 transformiert mit pSSBm85, bei dem die heterogene Gfp-Produktion beschrieben wurde (Münch *et al.*, 2015).

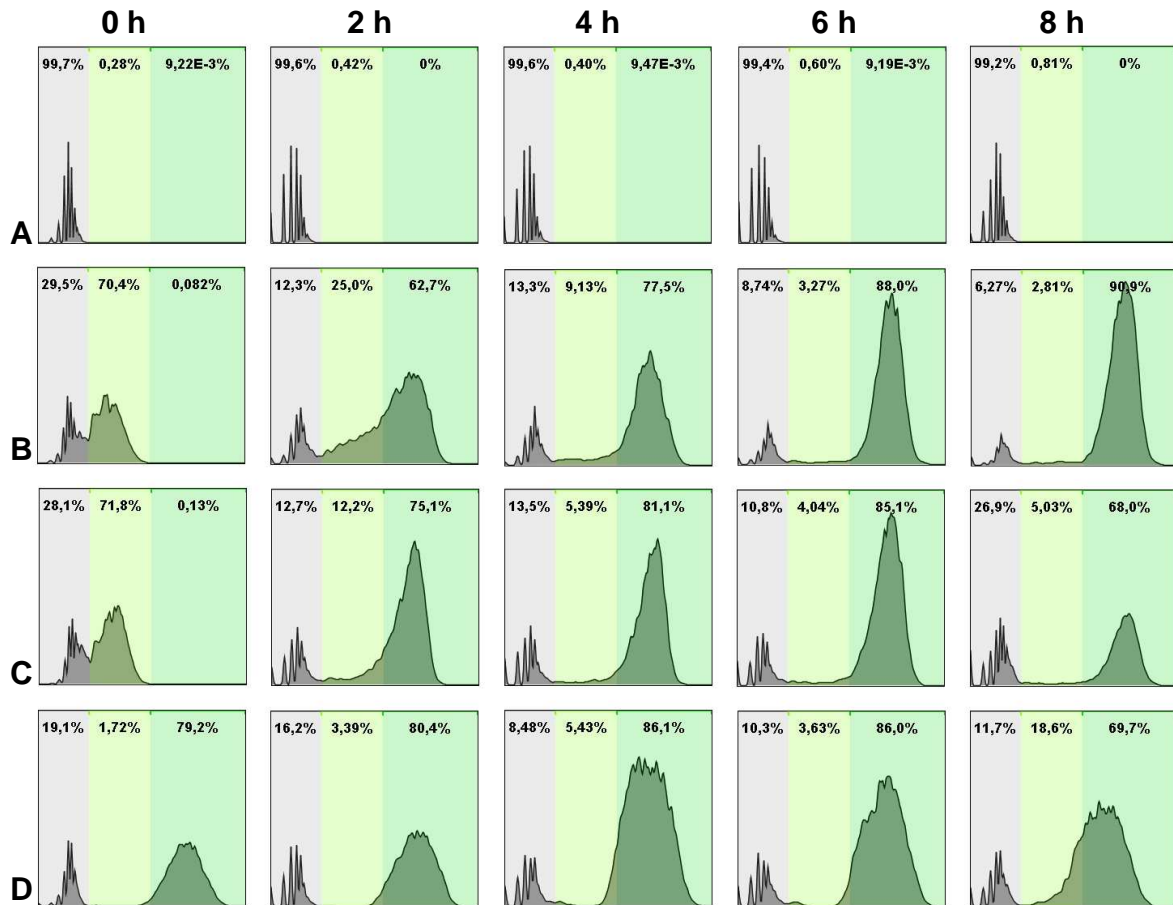


Abb. 24: Verteilung der Gfp-Fluoreszenz von *B. megaterium* Plasmid-Stämmen nach Durchflusszytometrie im Histogramm. Dargestellt ist die Verteilung von 10000 fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden *B. megaterium*-Zellen nach der Durchflusszytometrie von unterschiedlichen Stämmen und Messzeitpunkten (0 h, 2 h, 4 h und 8 h nach Induktion). Die Fluoreszenzintensität wurde gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen. Die drei unterschiedlichen farbigen Bereiche im Histogramm deuten auf nicht-fluoreszierende (grauer Bereich), wenig-fluoreszierende (hellgrüner Bereich) und fluoreszierende Zellen (grüner Bereich) hin. Reihe A diente als Referenz für nicht-fluoreszierende Zellen (Leervektor) und Reihe B als Referenzstamm für heterogene Phänotypen mit fluoreszierenden (grüner Bereich) und nicht-fluoreszierenden (grauer Bereich) *B. megaterium*-Zellen. Alle Messungen wurden als biologische Duplikate wiederholt und zeigten die gleiche Tendenz der Verteilung. Gezeigt sind die Ergebnisse aus einer Messung.

Reihe A: DSM319 transformiert mit pMM1520 (**Leervektor**)

Reihe B: DSM319 transformiert mit pSSBm85 (**Referenzstamm**)

Reihe C: WH377 ($\Delta xyIT$) transformiert mit pSSBm85 ($P_{xyIA}^{opt.}-gfp$)

Reihe D: DSM319 transformiert mit pRBBm258 ($P_{konstitutiv}-gfp$)

Abb. 24 zeigt, dass *B. megaterium* WH377 transformiert mit pSSBm85 (*xyIT*-Mutante, Reihe C) und DSM319 transformiert mit pRBBm258 (Expressionssystem mit konstitutivem Promotor, Reihe D) wieder zu deutlich heterogenen Phänotypen führten, obwohl die autokatalytische Genexpression des Transporters unterbrochen wurde. Beide Stämme zeigten zwei Stunden nach Induktion einen bistabilen Phänotyp durch zwei Peaks im Histogramm mit nicht-fluoreszierenden (grauer Bereich) und fluoreszierenden Zellen (grüner Bereich) und eine sehr ähnliche Verteilung im Vergleich zu DSM319 transformiert mit pSSBm85 (Referenzstamm,

Reihe B). Dabei lag der Anteil an fluoreszierenden Zellen (grüner Bereich) aus der Messung von Reihe B, C und D zwischen 62,7 und 80,4 % (2 h nach Induktion), 77,5 und 86,1 % (4 h nach Induktion), 85,1 und 88,0 % (6 h nach Induktion) und 68,0 und 90,9 % (8 h nach Induktion), wobei der Referenzstamm zwei und vier Stunden nach Induktion den geringsten Anteil an grünen Zellen zeigte, während acht Stunden nach Induktion deutlich mehr Zellen grün waren (90,9 %) im Vergleich zu den anderen Stämmen.

An dieser Stelle und auch in nachfolgenden Kapiteln ist zu berücksichtigen, dass der nicht-fluoreszierende Bereich im Histogramm (grauer Bereich) vermutlich auch Zellen repräsentiert, die sehr schwach fluoreszieren. In Vorversuchen (Kapitel 4.2) konnte gezeigt werden, dass die nicht-fluoreszierenden Zellen nach erneuter Kultivierung mit Antibiotika wieder Wachstum und eine erneute Aufspaltung in fluoreszierende und nicht-fluoreszierende Subpopulationen zeigten. Sie enthalten demnach noch Plasmide und produzieren vermutlich auch sehr geringe Mengen an Gfp, die nicht detektiert werden können. Auf die Darstellung der ü.N-Probe wurde verzichtet, da die Zellen nach 24 Stunden nicht mehr lebensfähig waren und kaum Fluoreszenz zeigten. Alle Messungen der Durchflusszytometrie wurden als biologische Duplikate wiederholt und zeigten die gleiche Tendenz der Verteilung von fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zellen.

Aus den Ergebnissen der Durchflusszytometrie wurde geschlossen, dass die autokatalytische Genexpression in diesem Fall des Transportergens *xyIT*, im Gegensatz zu *E. coli*, eine untergeordnete Bedeutung für die phänotypische Heterogenität in *B. megaterium* darstellte bzw. dass es womöglich auch keine ausschlaggebenden Unterschiede der Xylose-Transporter-Menge zwischen nicht- und fluoreszierenden Zellen im Wildtyp DSM319 gab. Diese Vermutung korrelierte auch mit parallel durchgeführten qRT-PCR-Analysen, die die *xyIT*-Expression in nicht- und fluoreszierenden Zellen untersuchte. Dabei zeigte sich, dass die *xyIT*-mRNA-Menge in beiden Subpopulationen nahezu gleich blieb (Münch *et al.*, 2015). Des Weiteren wurde festgestellt, dass Xylose auch über andere unbekannte Systeme in die Zelle transportiert zu werden scheint, da auch ohne Transporter eine Induktion der Gfp-Produktion in Anwesenheit von Xylose stattfand (Abb. 37, im Anhang).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die phänotypische Heterogenität auch bei Verwendung eines anderen Promotors (pRBBm258 mit konstitutivem Promotor)

auftrat und demnach kein spezifisches Problem des bisher verwendeten Xylose-induzierbaren Promotors ($P_{xyIA}^{opt.}$) ist.

4.2.1.2 Analyse des rekombinant produzierten XylT_{B.meg} in *Escherichia coli* C43(DE3)

Die Analyse und Detektion des Xylose-Transporters in der Zellmembran von fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zellen sollte parallel zu 4.2.1.1 auch mittels Gold-gelabelten Antikörpern erfolgen. Für die Untersuchung wurde zunächst das Membranprotein XylT_{B.meg} rekombinant in *E. coli* C43(DE3) pSWec9 (XylT_{B.meg}-His) produziert, was später der Antikörpergenerierung dienen sollte. Der Stamm C43(DE3) basiert auf dem Stamm BL21(DE3). Er besitzt eine undefinierte Mutationen, die die Überproduktion von Membranproteinen erleichtert (Miroux & Walker, 1996).

Für die rekombinante XylT_{B.meg} Produktion wurde die C43(DE3) pSWec9-Hauptkultur bis OD 0,4 wachsen gelassen und die *xyIT*-Expression mit 400 µM IPTG induziert. Die weitere Inkubation erfolgte für fünf Stunden bei 17 °C. Während der Kultivierung wurden stündlich 1 OD-Äquivalente entnommen, woraus 2×10^8 Zellen auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend mittels Western-Blot-Analyse untersucht wurden. Die Detektion erfolgte mittels primären Anti-His-Antikörper und sekundären Anti-Maus-Antikörper, an dem eine alkalische Phosphatase gekoppelt war. Diese katalysiert eine bestimmte Farbreaktion, wodurch sich ein blaues Präzipitat auf der Membran bildet und somit das Protein sichtbar gemacht wird (Abb. 25).

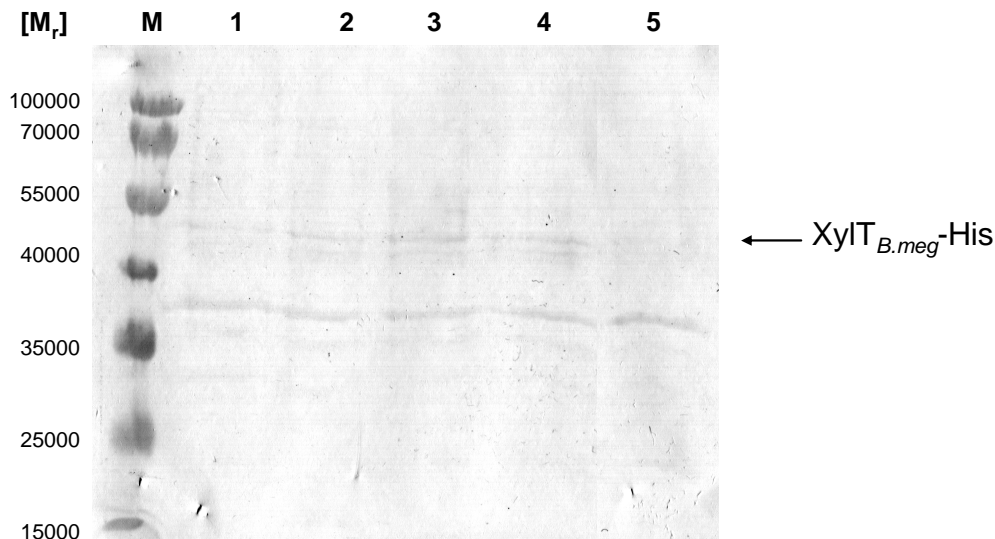


Abb. 25: Western-Blot-Analyse der Gesamtzellproteine von *E. coli* C43(DE3) transformiert mit pSWEc9. Dargestellt ist die Transfermembran nach dem Western-Blot zum Nachweis von XylT_{B.meg}-His aus den Gesamtzellproteinen von C43(DE3) pSWEc9 (XylT_{B.meg}-His). Die Proteine wurden auf eine PVDF-Transfermembran transferiert und der His-Tag durch einen Anti-His-Antikörper und einen Anti-Maus-Antikörper mit alkalischer Phosphatase nachgewiesen. Das Enzym katalysiert die Farbreaktion von BCIP und NBT, wobei sich ein blaues Präzipitat auf der Membran bildet und die Banden sichtbar gemacht werden.

Bahn M : PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)

Bahn 1-4 : *E. coli* Gesamtzellproteine 2, 3, 4 und 5 h nach Induktion mit 400 µM IPTG

Bahn 5 : *E. coli* Gesamtzellproteine ohne Induktion

Die Western-Blot-Analyse (Abb. 25) zeigt, dass zwei Banden in den *E. coli* Gesamtzellproteinen nach Induktion detektiert werden konnten (Bahn 1 bis 4). Davon befindet sich die obere Bande bei einer relativen Molekülmasse von ca. 53000, wobei es sich um das Fusionsprotein XylT_{B.meg}-His handelte ($M_r = 52200$). Auf dieser Höhe konnte in den Gesamtzellproteinen ohne Induktion (Bahn 5) keine Bande detektiert werden. Die untere Bande mit einer relativen Molekülmasse von ca. 38000 befand sich ebenfalls in den Gesamtzellproteinen ohne Induktion (Bahn 5), so dass es sich hier vermutlich um ein Protein handelt, dass falsch durch den Antikörper detektiert wurde.

Die rekombinante Proteinproduktion des Membranproteins verlief zwar erfolgreich, konnte aber trotz zahlreicher Wiederholungen nicht so optimiert werden, um für eine Antikörpergenerierung eingesetzt zu werden. Die Produktion von Membranproteinen kann mit erheblichen Hindernissen verbunden sein, da die Membran-Integration von größeren Mengen eines Membranproteins zu Wachstumsdefiziten bis hin zum Zelltod führen kann (Miroux & Walker, 1996). Aus diesem Grund und durch die parallel vorliegenden Ergebnisse der Durchflusszytometrie-Analyse aus Kapitel 4.2.1.1, dass die Xylose-Permease keinen deutlichen Einfluss auf die

Entstehung der heterogenen Phänotypen zeigte, wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt.

4.2.2 Repressor-Induktor Ungleichgewicht durch high-copy Plasmide als Ursache für phänotypische Heterogenität

Die phänotypische Heterogenität wird oft während natürlicher Prozesse, wie Persistenz, Kompetenz, Sporulation, Kannibalismus, Motilität und Biofilmbildung beschrieben. Die phänotypische Heterogenität während der rekombinanten Gfp-Produktion in *B. megaterium* stellt aber ein System dar, bei dem ein Expressionsvektor rekombinant eingebracht wurde, der das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des Xylose-induzierbaren Promotors $P_{xyIA}^{opt.}$ trägt. Die Verwendung eines Vektors stellt daher auch einen neuen möglichen Faktor dar, der im Zusammenhang mit der Entstehung der phänotypischen Heterogenität stehen kann.

Expressionssysteme beruhen oft auf high-copy Plasmiden, da eine hohe Genkopienzahl meistens zu einer hohen Expression des entsprechenden Gens führt (French & Ward, 1996). Das Xylose-induzierbare Expressionssystem aus *B. megaterium* stammt ursprünglich aus dem Xylose-Operon von *B. megaterium*. Der Xylose-induzierbare Promotor P_{xyIA} und das Repressor-Gen *xyIR* wurden in ein high-copy Plasmid kloniert und ermöglichen die kontrollierte Expression von *gfp* sowie anderer erwünschter Gene nach der Zugabe von Xylose (Rygus *et al.*, 1991) (Kapitel 1.4). Durch ein high-copy Expressionssystem wird neben dem Genom-basierten *xyIR* ein zweites Repressorgen in das System eingebracht, das eine hohe Kopienzahl aufweist. Dies hat zur Folge, dass eine größere Menge des Repressor-Proteins in der Zelle vorliegt. Da die Xylose-Aufnahme jedoch durch Transport begrenzt sein kann, da sie nicht frei durch die Zellmembran diffundiert, kann es zu einem erhöhten Anstieg an Xylose-freiem Repressor in der Zelle kommen. Dadurch kann das Gleichgewicht zwischen Xylose-gebundenem und Xylose-freiem XylR auf die Seite des Xylose-freien Repressors verschoben werden. In Zellen, in denen sich größere Menge des Xylose-freien Repressors befindet, kann das Xylose-induzierbare Expressionssystem dadurch in einem Teil der Population reprimiert bleiben, so dass ein „nicht-induzierender bzw. -fluoreszierender Phänotyp“ entsteht. Die Entstehung von „induzierten bzw. fluoreszierenden Phänotypen“ liegt vermutlich an unterschiedlichen Mengen an Xylose-freiem Repressor in den Zellen, da geringere Mengen des Repressors in den Zellen durch Rauschen in der

xyIR-Genexpression (Kapitel 1.5.1.1) und durch Variationen in der Plasmidkopienzahl (1.5.1.2) begründet sein können. Die Expressionsvektoren werden während der Zellteilung zufällig auf die Tochterzellen verteilt (Friehs, 2004), wodurch auch Variationen in der Gendosis von *xyIR* und somit in der Menge des Repressors zwischen den einzelnen Zellen auftreten können. Da das *gfp*-Expressionssystem in *B. megaterium* auch auf einem high copy-Plasmid beruht (Bernhardt *et al.*, 1978), wird das Repressor-Induktor Ungleichgewicht als Ursache für die phänotypische Heterogenität in dieser Arbeit mit einbezogen.

4.2.2.1 Analyse und Einfluss von unterschiedlichen Induktor-Konzentrationen mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

Für die Analyse des Einflusses von unterschiedlichen Induktor-Konzentrationen auf das Repressor-Induktor Ungleichgewicht wurde der Promotor des Expressionssystems mit höheren Xylose-Konzentrationen induziert, um das Gleichgewicht auf die Seite des Xylose-gebundenen inaktiven Repressors zu verschieben.

Zunächst wurde die rekombinante Gfp-Produktion mit unterschiedlichen Induktor-Konzentrationen von 0,5, 1 und 2 % (w/v) Xylose im BioLector untersucht. Die Analyse zeigte, dass die Gfp-Produktion bei allen Induktor-Konzentrationen sehr ähnlich verlief. Die Gfp-Menge nahm lediglich neun Stunden nach Inokulation bei höheren Xylose-Konzentrationen etwas langsamer ab (Abb. 38, im Anhang).

Für die Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden erneut jeweils 50 mL einer A5+4-ü.N.-Kultur mit DSM319 transformiert mit pMM1520 (Leervektor) und DSM319 transformiert mit pSSBm85 ($P_{xyIA}^{opt.}$) kultiviert. Darauf folgend wurden jeweils 100 mL einer A5+4-Hauptkultur 1:100 angeimpft, die bis zu einer $OD_{578\text{ nm}}$ von 0,3 inkubiert wurde. Aus diesen Hauptkulturen wurden Proben auf eine $OD_{578\text{ nm}}$ von 0,005 eingestellt und direkt vermessen (0 h, Abb. 26). Die Kulturen wurden mit 0,5, 1 oder 2 % (w/v) Xylose induziert und weiter inkubiert. Zwei, vier, sechs und acht Stunden nach Induktion erfolgte die Probennahme. Als Referenz für nicht-fluoreszierende Zellen diente *B. megaterium* DSM319 transformiert mit pMM1520 (Leervektor), als Referenzstamm für heterogene Phänotypen *B. megaterium* DSM319 transformiert mit pSSBm85 mit 0,5 % (w/v) Xylose (Abb. 26).

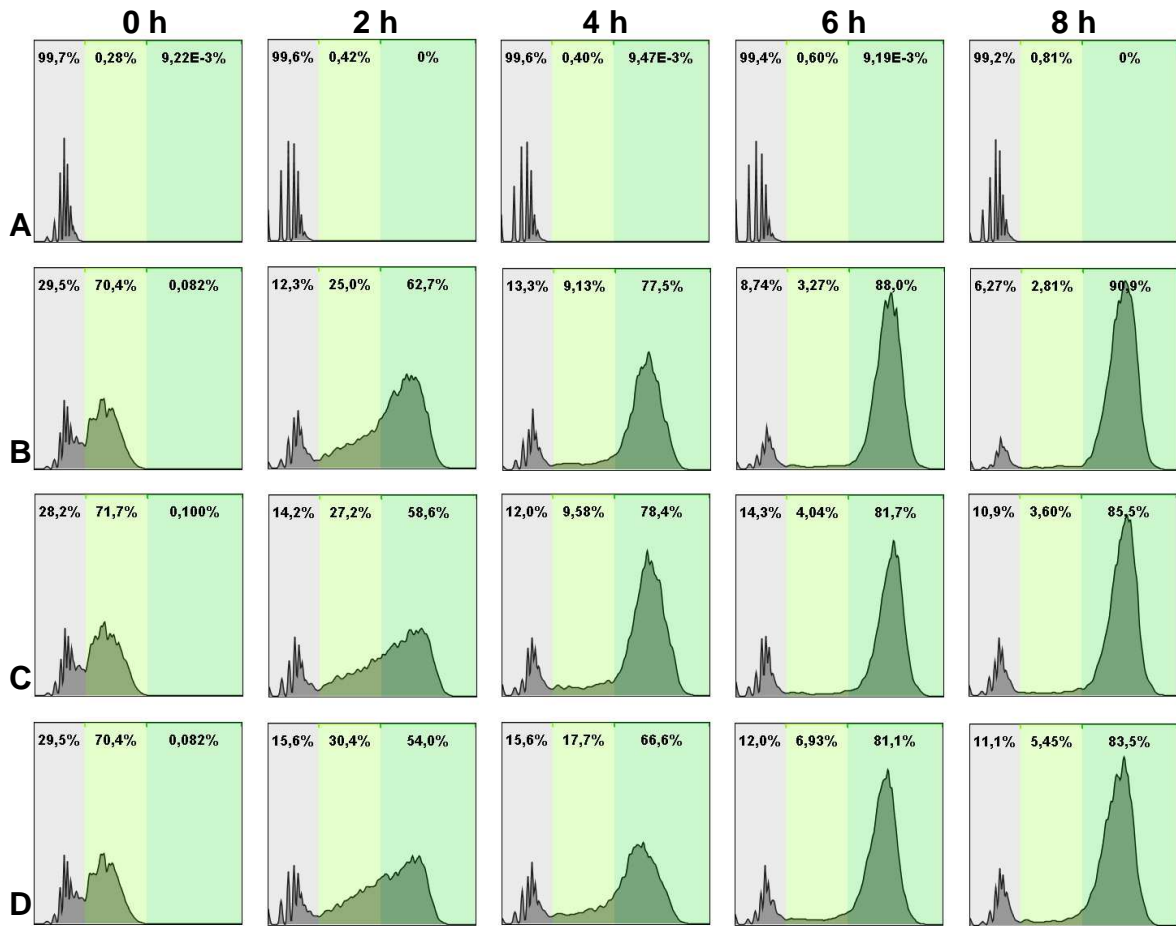


Abb. 26: Verteilung der Gfp-Fluoreszenz von *B. megaterium* Plasmid-Stämmen nach Durchflusszytometrie im Histogramm. Dargestellt ist die Verteilung von 10000 fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden *B. megaterium*-Zellen nach der Durchflusszytometrie von unterschiedlichen Stämmen und Messzeitpunkten (0 h, 2 h, 4 h und 8 h nach Induktion). Die Fluoreszenzintensität wurde gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen. Die drei unterschiedlichen farbigen Bereiche im Histogramm deuten auf nicht-fluoreszierende (grauer Bereich), wenig-fluoreszierende (hellgrüner Bereich) und fluoreszierende Zellen (grüner Bereich) hin. Reihe A diente als Referenz für nicht-fluoreszierende Zellen (Leervektor) und Reihe B als Referenzstamm für heterogene Phänotypen mit fluoreszierenden (grüner Bereich) und nicht-fluoreszierenden (grauer Bereich) *B. megaterium*-Zellen. Alle Messungen wurden als biologische Duplikate wiederholt und zeigten die gleiche Tendenz der Verteilung. Gezeigt sind die Ergebnisse aus einer Messung.

Reihe A: DSM319 transformiert mit pMM1520 (**Leervektor**)

Reihe B: DSM319 transformiert mit pSSBm85 (**Referenzstamm**), Induktion mit 0,5 % Xylose

Reihe C: DSM319 transformiert mit pSSBm85 ($P_{xyA}^{opt.}$ -**gfp**), Induktion mit 1 % Xylose

Reihe D: DSM319 transformiert mit pSSBm85 ($P_{xyA}^{opt.}$ -**gfp**), Induktion mit 2 % Xylose

Abb. 26 zeigt, dass auch die Induktion mit 1 % (Reihe C) und 2 % (w/v) Xylose (Reihe D) wieder zu deutlich heterogenen Phänotypen führte. Auch die erhöhten Xylose-Konzentrationen zeigten zwei Stunden nach Induktion einen bistabilen Phänotyp durch zwei Peaks im Histogramm mit nicht-fluoreszierenden (grauer Bereich) und fluoreszierenden Zellen (grüner Bereich). Die Verteilung der weißen und grünen Zellen, die mit 1 bzw. 2 % (w/v) Xylose induziert wurden, war ähnlich zum Referenzstamm, der standardmäßig mit 0,5 % (w/v) Xylose induziert wurde

(Reihe B). Dabei lag der Anteil an fluoreszierenden Zellen (grüner Bereich) aus der Messung von Reihe B, C und D zwischen 54,0 und 62,7 % (2 h nach Induktion), 66,6 und 78,4 % (4 h nach Induktion), 81,1 und 88,0 % (6 h nach Induktion) und 83,5 und 90,9 % (8 h nach Induktion).

Aus dieser Analyse wurde geschlossen, dass eine gesteigerte Xylose-Konzentration keinen Einfluss auf die phänotypische Heterogenität zeigte. Dies lässt sich aber auch damit begründen, dass trotz erhöhter Konzentration im Medium vermutlich nicht mehr Xylose in die Zelle aufgenommen werden kann, da die Xylose nicht frei durch die Zellmembran diffundiert, sondern aktiv über den Xylose- oder einen anderen Zucker-Transporter aufgenommen wird. Diese Vermutung wird durch die absolute Gfp-Quantifizierung nach Induktion mit höheren Xylose-Konzentrationen unterstützt, bei der sich nur die zuvor diskutierten geringen Unterschiede in Bezug auf die Gfp-Menge zeigten (Abb. 38, im Anhang).

4.2.2.2 Analyse und Einfluss von Plasmiden mit unterschiedlichen Replikationsursprüngen mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

Für die weiteren Analysen wurden vier neue Expressionsvektoren kloniert (pSWBm09, pSWBm14, pSWBm16 und pSWBm17), die unterschiedliche Replikationsursprünge („origin of replication“, *ori*) enthielten und auf dem Plasmid pSSBm85 mit $P_{xylA}^{opt.}$ basierten (Harth, 2014). Damit wurde untersucht, ob sich hier ein mögliches Repressor-Induktor Ungleichgewicht bzw. die phänotypische Heterogenität durch eine veränderte Plasmidkopienzahl beeinflussen lässt. Die Plasmidkopienzahl folgt aus den verschiedenen Replikationsursprüngen (*ori*) der Plasmide (Boros *et al.*, 1984; Müller *et al.*, 1995). Plasmide mit veränderter Kopienzahl führen auch zu einer veränderten Genkopienanzahl des Repressorgens *xylR* und damit auch zu einer veränderten Menge an XylR innerhalb der Zelle. Bei der Untersuchung handelte es sich um Replikationsursprünge aus *B. megaterium* (für pSWBm09, pSWBm17), *B. subtilis* (für pSWBm14) und *S. aureus* (für pSWBm16). In der Literatur waren die verwendeten *oris* sowie deren Plasmidkopienzahl und Ursprungsplasmide bereits beschrieben (Tabelle 17). Die Tabelle listet fünf Plasmide mit unterschiedlichen Replikationsursprüngen aus verschiedenen Organismen (*B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *S. aureus*) auf, wovon sich drei nach dem rolling circle- und zwei nach dem θ -Mechanismus

replizieren. Die Plasmidkopienzahl der Ursprungsplasmide deckt einen Bereich von 1 bis 25 ab.

Tabelle 17: In dieser Arbeit getestete Plasmide. Dargestellt sind die Replikationsursprünge der Ursprungsplasmide, Replikationsmechanismen und Plasmidkopienzahl.

Vektor	ori/ rep-Gen	Ursprungsplasmid und Replikationsmechanismus	Plasmidkopienzahl der Ursprungsplasmide
pSSBm85	oriU/ repU	pBC16 (aus <i>B. cereus</i>), rolling circle	20 (Bernhard <i>et al.</i> , 1978)
pSWBm09	oriBM100/ repBM100	pBM100 (aus <i>B. megaterium</i>), rolling circle	3 (Eppinger <i>et al.</i> , 2011)
pSWBm14	oriA/ repA	pBS72 (aus <i>B. subtilis</i>), θ-Mechanismus	6 (Titok <i>et al.</i> , 2003)
pSWBm16	oriF/ repF	pE194 (<i>S. aureus</i>), rolling circle	10-25 (Weisblum <i>et al.</i> , 1979)
pSWBm17	oriBM700/ repBM700	pBM700 (aus <i>B. megaterium</i>), θ-Mechanismus	1 (Eppinger <i>et al.</i> , 2011)

Die Auswahl dieser Replikationsursprünge wurde getroffen, da bereits bekannt war, dass sich Plasmide mit *oris* aus *B. megaterium* (*oriBM100*, *oriBM700*) und *S. aureus* (*oriF*) in *B. megaterium* DSM319 stabil replizieren können (Kieselburg *et al.*, 1984; Wittchen & Meinhardt, 1995). Da Replikationsursprünge meist ein breites Wirtsspektrum haben und so in vielen verschiedenen Organismen vermehrt werden können (Jain & Srivastava, 2013), wurde auch ein bisher für *B. megaterium* nicht untersuchter *ori* aus *B. subtilis* (*oriA*) in *B. megaterium* DSM319 getestet, um einen weiteren θ-Ursprung zu analysieren.

Nachdem über das Aufnehmen einer Wachstumskurve im BioLector (Abb. 39, im Anhang) gezeigt wurde, dass die neuen *ori*-Konstrukte in *B. megaterium* stabil repliziert werden konnten, erfolgte die Quantifizierung des produzierten Gfp. Diese zeigte, dass abhängig vom Replikationsursprung unterschiedliche Mengen an Gfp produziert wurden (Abb. 27).

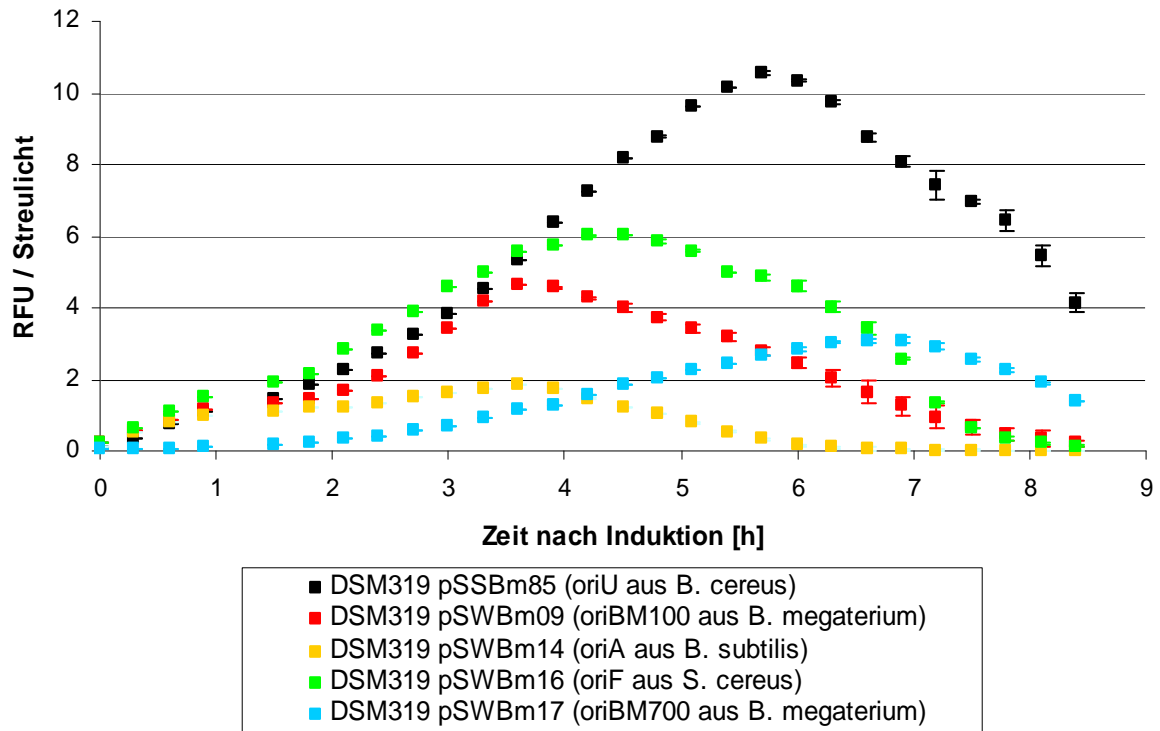


Abb. 27: GFP-Quantifizierung im BioLector von *B. megaterium*-Plasmidstämmen mit unterschiedlichen *ori*-Konstrukten. Die Abbildung zeigt die mittlere relative Fluoreszenzeinheit („relative fluorescence unit“, RFU) pro Streulicht in Abhängigkeit von der Zeit nach Induktion mit 0,5 % (w/v) Xylose. Die Messungen erfolgten als Triplikate. Das Streulicht (gemessen bei 620 nm) dient als Maß für die Biomasse, die RFU (gemessen bei 486 nm) für die Fluoreszenz. Die Kultivierung erfolgte in einer 48-Wellplatte mit 1 mL A5+4-Kulturvolumen bei 1400 rpm und 37 °C im BioLector.

Abb. 27 zeigt, dass der Referenzstamm DSM319 transformiert mit pSSBm85 (*ori* aus pBC16) das höchste Gfp-Maximum mit 10,5 RFU/Streulicht (nach 5,7 h, schwarze Kurve), gefolgt von DSM319 transformiert mit pSWBm16 (*ori* aus pE194) mit 6,1 RFU/Streulicht (nach 4,5 h, grüne Kurve), DSM319 transformiert mit pSWBm09 (*ori* aus pBM100) mit 4,6 RFU/Streulicht (nach 3,6 h, rote Kurve), DSM319 transformiert mit pSWBm17 (*ori* aus pBM700) mit 3,1 RFU/Streulicht (nach 6,6 h, blaue Kurve) und DSM319 transformiert mit pSWBm14 (*ori* aus pBS72) das niedrigste Gfp-Maximum von 1,8 RFU/Streulicht (nach 3,6 h, gelbe Kurve) aufwies. Da neben dem Promotor und Operator sowie Ribosombindestelle alle funktionellen Elemente auf den Plasmiden identisch sind, wurde die rekombinante Gfp-Produktion von den verwendeten *oris* und *rep*-Genen und somit vermutlich von der Kopienzahl und Stabilität des jeweiligen Plasmids beeinflusst.

Die Ergebnisse zeigten, dass eine hohe Kopienzahl auch zu einer hohen maximalen Gfp-Menge (DSM319 transformiert mit pSSBm85 mit einer Plasmidkopienzahl von 20 und DSM319 transformiert mit pSWBm16 mit einer Plasmidkopienzahl von 10-25) führte (Tabelle 17). Eine hohe Kopienzahl bedeutet eine höhere Gendosis, so dass

die Häufigkeit der Transkription des entsprechenden Gens steigt. Allerdings korrelierte die Anzahl der für die Ausgangsplasmide beschriebenen Plasmidkopien aller fünf Vektoren im Vergleich zueinander nicht mit der Menge der maximalen Gfp-Produktion (Tabelle 17 und Abb. 27). So wurde beispielsweise in *B. megaterium* mit pSWBm14 mit einer Kopienzahl von 6 Plasmiden pro Zelle ein geringeres Gfp-Maximum erreicht als mit pSWBm17 mit einer Kopienzahl von einem Plasmid pro Zelle. Diese Beobachtung könnte somit auch ein Hinweis auf die unterschiedliche Plasmidstabilität der Plasmide sein, die ebenfalls Einfluss auf die *gfp*-Expression nehmen kann oder auf veränderte Plasmidkopienzahlen im Vergleich zu den Ursprungsplasmiden (Tabelle 17). Die Bestimmung der Plasmidkopienzahl der Ursprungsplasmide erfolgte unabhängig voneinander, mit verschiedenen Methoden, zu unterschiedlichen Zeitpunkten, in unterschiedlichen Bakterien und Plasmiden mit anderer Ausstattung und vor allem Größe im Vergleich zu den hier untersuchten Plasmiden. Diese Faktoren, vorallem die Plasmidgröße, können die Plasmidkopienzahl erheblich beeinflussen (Brückner, 1992). Daher können die Plasmidkopienzahlen der Ursprungsplasmide nicht direkt auf die hier untersuchten Plasmide bezogen werden. Aus diesem Grund wurde die Plasmidkopienzahl von pSSBm85, pSWBm09, pSWBm14, pSWBm16 und pSWBm17 nach Transformation von *B. megaterium* DSM319 mit der quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) nach Kapitel 3.5.13 bestimmt (N. Langreder, 2016). Die Probenentnahmen für die Gfp-Quantifizierung am Fluoreszenzspektrometer und die Bestimmung der Plasmidkopienzahl erfolgten parallel aus einer Schüttelkolben-Kultivierung, so dass ein direkter Vergleich zwischen der Gfp-Produktion und der Plasmidkopienzahl angestellt werden konnte (Abb. 28).

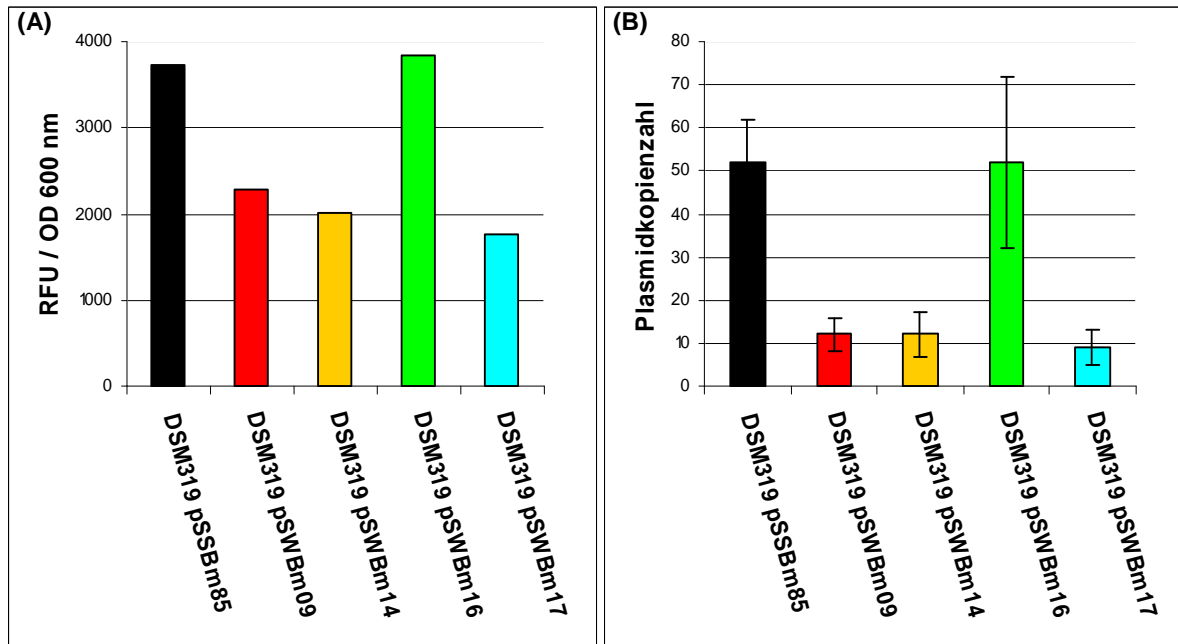


Abb. 28: (A) Gfp-Quantifizierung und (B) Plasmidkopienzahl aus *B. megaterium*-Plasmidstämmen mit unterschiedlichen *ori*-Konstrukten. (A) Das Säulendigramm stellt die RFU/OD_{600 nm} der Stämme DSM319 transformiert mit pSSBm85, pSWBm09, pSWBm14, pSWBm16 bzw. pSWBm17 dar. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelkolben. Die Probenentnahme erfolgte 3 h nach Induktion mit 0,5 % (w/v) Xylose. Die RFU wurden mit dem Lumineszenzspektrometer LS 55 (475 nm) und die optische Dichte im Photometer gemessen (600 nm). (B) Das Säulendigramm stellt die mittlere Plasmidkopienzahl aus Triplikaten der Stämme DSM319 transformiert mit pSSBm85, pSWBm09, pSWBm14, pSWBm16 bzw. pSWBm17 dar. Die Probenentnahme erfolgte 3 h nach Induktion mit 0,5 % (w/v) Xylose und parallel zur Probenentnahme für die Gfp-Quantifizierung. Die Ergebnisse wurde in Kooperation mit N. Langreder erzielt.

Abb. 28 zeigt, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Gfp-Produktion (Abb. 28 A) und der Plasmidkopienzahl (Abb. 28 B) besteht. Dabei korreliert die höchste RFU/OD_{600 nm} mit der höchsten Plasmidkopienzahl und umgekehrt. Tabelle 18 zeigt die RFU/OD_{600 nm}-Werte mit entsprechender Plasmidkopienzahl der Größe nach geordnet im Überblick.

Tabelle 18: Nach höchster RFU/OD_{600 nm} und ermittelter Plasmidkopienzahl geordnete Plasmide im Vergleich zur Plasmidkopienzahl der Ausgangsplasmide.

	Vektor	RFU/OD _{600 nm}	ermittelte Plasmidkopienzahl	Plasmidkopienzahl der Ausgangsplasmide
1	pSWBm16	3832	52 ± 20	10-25
2	pSSBm85	3739	52 ± 10	20
3	pSWBm09	2282	12 ± 4	3
4	pSWBm14	2026	12 ± 5	6
5	pSWBm17	1754	9 ± 4	1

Nach der Definition von Mayer werden pSWBm16 und pSSBm85 mit einer PCN von etwa 50 zu den high-copy Plasmiden gezählt und pSWBm09, pSWBm14 und pSWBm17 (PCN von 12 bzw. 9) zu den low-copy Plasmiden (Mayer, 1995). Mit Hilfe der Bestimmung der Plasmidkopienzahl im hier genutzten Plasmidhintergrund zeigte sich, dass somit zwei verschiedene high-copy und drei low-copy Plasmide zur Verfügung standen, mit denen der Einfluss verschiedener Plasmidkopienzahlen auf das Repressor-Induktor Ungleichgewicht bzw. die phänotypische Heterogenität untersucht werden konnte.

Für die Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden jeweils 50 mL einer A5+4-ü.N.-Kultur von DSM319 transformiert mit pSSBm85 (*oriU_{B.cereus}*), DSM319 transformiert mit pSWBm09 (*oriBM100_{B.meg}*), DSM319 transformiert mit pSWBm14 (*oriA_{B.sub}*), DSM319 transformiert mit pSWBm16 (*oriF_{S.aureus}*) und DSM319 transformiert mit pSWBm17 (*oriBM700_{B.meg}*) kultiviert und darauf folgend wie zuvor beschrieben eine Hauptkultur angeimpft, die bis zu einer OD_{578 nm} von 0,3 inkubiert wurde. Aus diesen Hauptkulturen wurde je eine Probe direkt vermessen (0 h, Abb. 29). Zwei, vier, sechs und acht Stunden nach Induktion erfolgte die weitere Probennahme. Als Referenz für nicht-fluoreszierende Zellen diente wieder *B. megaterium* DSM319 transformiert mit pMM1520 und als Referenzstamm für heterogene Phänotypen *B. megaterium* DSM319 transformiert mit pSSBm85 (Abb. 29).

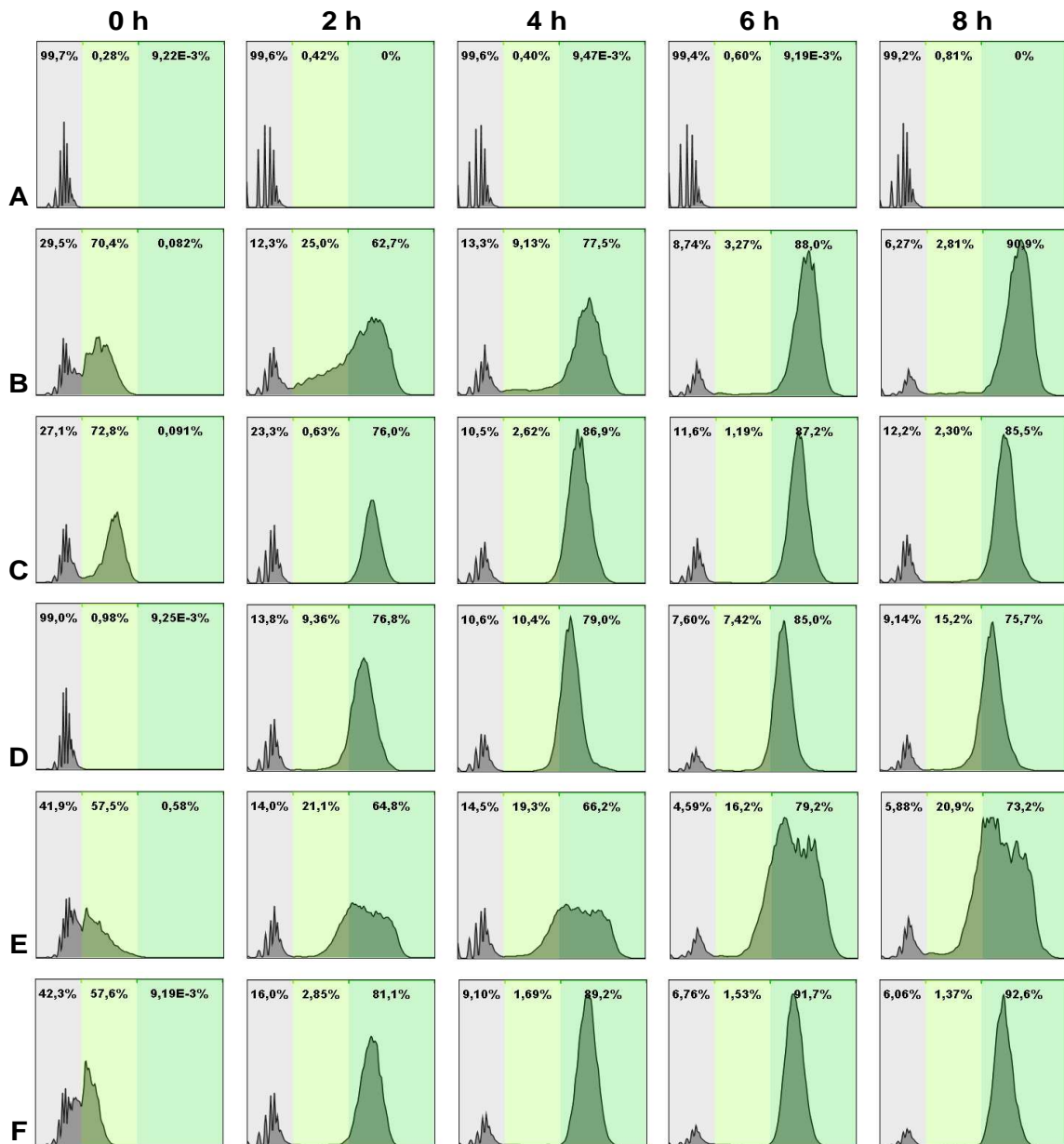


Abb. 29: Verteilung der Gfp-Fluoreszenz von *B. megaterium* Plasmid-Stämmen nach Durchflusszytometrie im Histogramm. Dargestellt ist die Verteilung von 10000 fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden *B. megaterium*-Zellen nach der Durchflusszytometrie von unterschiedlichen Stämmen und Messzeitpunkten (0 h, 2 h, 4 h und 8 h nach Induktion). Die Fluoreszenzintensität wurde gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen. Die drei unterschiedlichen farbigen Bereiche im Histogramm deuten auf nicht-fluoreszierende (grauer Bereich), wenig-fluoreszierende (hellgrüner Bereich) und fluoreszierende Zellen (grüner Bereich) hin. Reihe A diente als Referenz für nicht-fluoreszierende Zellen (Leervektor) und Reihe B als Referenzstamm für heterogene Phänotypen mit fluoreszierenden (grüner Bereich) und nicht-fluoreszierenden (grauer Bereich) *B. megaterium*-Zellen. Alle Messungen wurden als biologische Duplikate wiederholt und zeigten die gleiche Tendenz der Verteilung. Gezeigt sind die Ergebnisse aus einer Messung.

Reihe A: DSM319 transformiert mit pMM1520 (Leervektor)

Reihe B: DSM319 transformiert mit pSSBm85 (P_{xylA}^{opt} -gfp, $oriU_{B.cereus}$, Referenzstamm)

Reihe C: DSM319 transformiert mit pSWBm09 (P_{xylA}^{opt} -gfp, $oriBM100_{B.meg}$)

Reihe D: DSM319 transformiert mit pSWBm14 (P_{xylA}^{opt} -gfp, $oriA_{B.sub}$)

Reihe E: DSM319 transformiert mit pSWBm16 (P_{xylA}^{opt} -gfp, $oriF_{S.aureus}$)

Reihe F: DSM319 transformiert mit pSWBm17 (P_{xylA}^{opt} -gfp, $oriBM700_{B.meg}$)

Abb. 29 zeigt, dass die unterschiedlichen Plasmid-Stämme (Reihe C, D, E, F) wieder zu deutlich heterogenen Phänotypen führten. Alle Stämme zeigten zwei Stunden nach Induktion einen bistabilen Phänotyp mit nicht-fluoreszierenden und fluoreszierenden Zellen. Die Fluoreszenz-Verteilung der *B. megaterium*-Stämme mit unterschiedlichen *ori*-Konstrukten zeigte wieder Ähnlichkeiten zum Referenzstamm DSM319 transformiert mit pSSBm85 (Reihe B).

Dabei lag der Anteil an fluoreszierenden Zellen (grüner Bereich) aus der Messung von Reihe B, C, D, E und F zwischen 62,7 und 81,1 % (2 h nach Induktion), 66,2 und 89,2 % (4 h nach Induktion), 79,2 und 91,7 % (6 h nach Induktion) und 73,2 und 92,6 % (8 h nach Induktion). Zwei Stunden nach Induktion zeigte der Referenzstamm die wenigsten grünen Zellen während ab 4 Stunden nach Induktion der Plasmidstamm mit dem *ori* aus *S. aureus* den geringsten Anteil an grünen Zellen aufwies.

Im Vergleich zu Abb. 27 und 28 zeigen die Histogramme (Abb. 29), dass ein großer Anteil an fluoreszierenden Zellen (grüner Bereich) nicht automatisch mit einer hohen Menge an produziertem Gfp in Verbindung steht. Beispielsweise zeigen DSM319 transformiert mit pSSBm85 und DSM319 transformiert mit pSWBm17 eine ähnliche Verteilung der fluoreszierenden Zellen mit 88 % bzw. 92 % im Histogramm (Abb. 29, 6 h nach Induktion), obwohl sich ihr Gfp-Maxium zu diesem Zeitpunkt um das 3-fache unterscheidet (Abb. 27). Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie geben somit keinen Hinweis auf die absolute Menge an produzierten Gfp. Außerdem konnte hiermit gezeigt werden, dass die phänotypische Heterogenität nicht nur bei sehr starker Gfp-Produktion auftrat, etwa durch eine Art Akkumulation von großen Gfp-Mengen, so dass eine Gfp-Akkumulation als Ursache für die phänotypische Heterogenität bzw. für das Auftreten von stark-fluoreszierenden Subpopulation ausgeschlossen werden konnte. Dies zeigte beispielsweise der Stamm DSM319 transformiert mit pSWBm14 (Abb. 29, Reihe D), der über den gesamten Zeitraum zwei unterschiedliche Zustände (fluoreszierende und nicht-fluoreszierende Zellen) aufwies, obwohl dieser über den gesamten Zeitraum nur wenig Gfp produzierte (Abb. 27 und 28).

Aus dieser Analyse wurde geschlossen, dass die Replikons der Plasmide und die damit verbundenen unterschiedlichen Plasmidkopienzahlen (Tabelle 18) geringeren Einfluss auf die phänotypische Heterogenität bzw. auf das Repressor-Induktor Ungleichgewicht haben. Auf die untergeordnete Rolle des Ungleichgewichts

zwischen Repressor und Induktor deutete auch eine nicht-veröffentlichte Studie hin, in der zusätzliche Plasmid-basierte Bindestellen für das Repressorprotein eingeführt wurden, um die größere Menge an freiem Repressor zu reduzieren. Die Analyse bestätigte auch hier, dass die Zellen einer Population wieder heterogene Phänotypen zeigten (persönliche Koresspondanz, AG Münch, TU Braunschweig).

Außerdem kann die geringere Kopienzahl der eingesetzten low-copy Plasmide (pSWBm09, pSWBm14 und pSWBm17) zu einer zufälligen schlechteren Verteilung der Plasmide auf die Tochterzellen führen (Kapitel 1.5.1.2, stochastische Verteilungseffekte), so dass Subpopulationen mit unterschiedlichen Phänotypen entstehen können.

4.2.2.3 Analyse und Einfluss einer *Bacillus megaterium xyIR*-Muntante mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

Nach Ergebnissen aus Kapitel 4.2.2.2 wurde final überprüft, ob eine Chromosom- und Plasmid-basierte *xyIR*-Deletionsmutante einen Einfluss auf die phänotypische Heterogenität hatte. Spielt das Repressor-Induktor Ungleichgewicht als Ursache für die phänotypische Heterogenität eine Rolle, könnte ein Repressor-freier Stamm demnach zu einem homogenen Phänotyp führen. Zunächst wurde die Gfp-Produktion des Repressor-freien Stamms WH321 (Rygus & Hillen, 1992) transformiert mit pKMMBm5 ($P_{xyIA}^{opt.}$ -*gfp* ohne Plasmid-basiertes *xyIR*, Münch *et al.*, 2015) untersucht und zeigte eine konstitutive *gfp*-Expression ohne Induktion mit Xylose (Abb. 40, im Anhang). Dabei wurden etwa 10,6 % an maximaler relativer Fluoreszenz pro Zelle im Vergleich zum Referenzstamm DSM319 transformiert mit pSSBm85 erzielt. Es wurde vermutet, dass die ständige Expression hoher Mengen an high-copy Plasmid-basiertem *gfp* eine Belastung für den Organismus darstellte, der zu dem beobachteten geringen Gfp-Maximum führte. Des Weiteren produzierte der Stamm schon von Beginn an (0 h nach Inokulation) eine 2,4-fache höhere Menge an Gfp im Vergleich zum nicht-induzierten Referenzstamm.

Für die Analyse mittels Durchflusszytometrie wurde eine A5+4-ü.N.-Kultur von WH321 ($\Delta xyIR$) transformiert mit pKMMBm5 ($\Delta xyIR$) kultiviert, eine Hauptkultur angeimpft und darauf folgend wie beschrieben kultiviert und inkubiert. Aus den Hauptkulturen wurden Proben entnommen und direkt vermessen (0 h, Abb. 30). Zwei, vier, sechs und acht Stunden nach Induktion erfolgte die Probennahme. Als Referenz für nicht-fluoreszierende Zellen diente der *B. megaterium* DSM319

transformiert mit pMM1520 und als Referenzstamm für heterogene Phänotypen *B. megaterium* DSM319 transformiert mit pSSBm85 (Abb. 30).

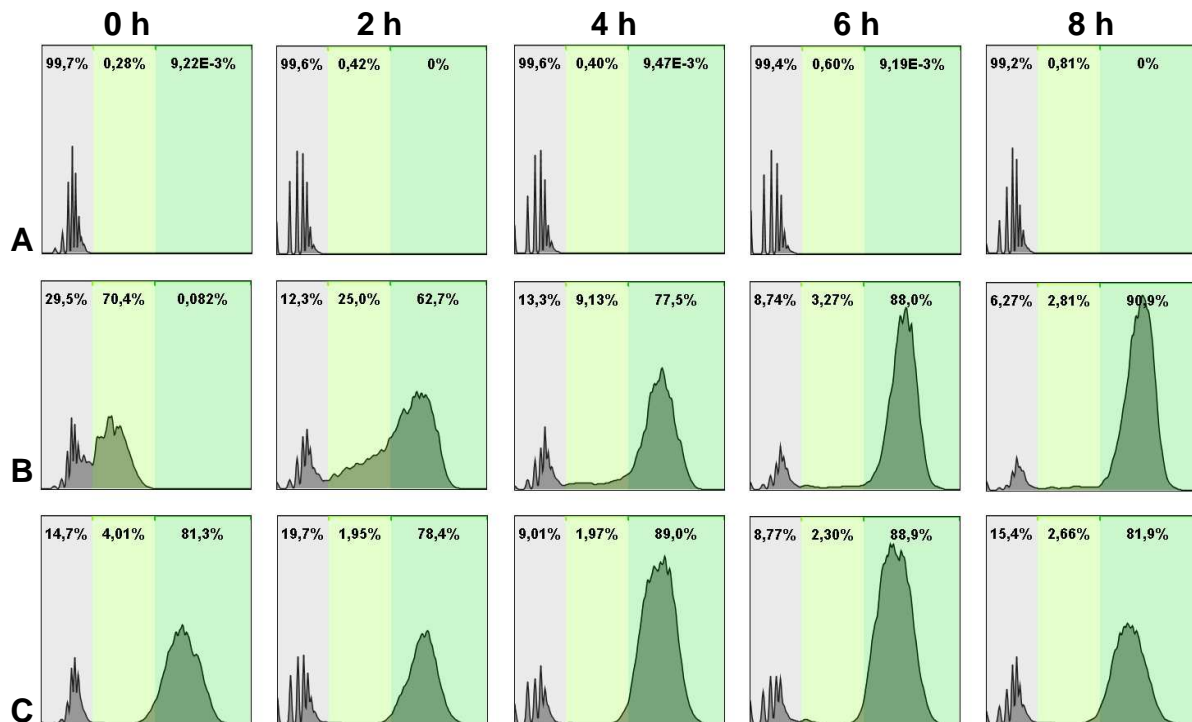


Abb. 30: Verteilung der Gfp-Fluoreszenz von *B. megaterium* Plasmid-Stämmen nach Durchflusszytometrie im Histogramm. Dargestellt ist die Verteilung von 10000 fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden *B. megaterium*-Zellen nach der Durchflusszytometrie von unterschiedlichen Stämmen und Messzeitpunkten (0 h, 2 h, 4 h und 8 h nach Induktion). Die Fluoreszenzintensität wurde gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen. Die drei unterschiedlichen farbigen Bereiche im Histogramm deuten auf nicht-fluoreszierende (grauer Bereich), wenig-fluoreszierende (hellgrüner Bereich) und fluoreszierende Zellen (grüner Bereich) hin. Reihe A diente als Referenz für nicht-fluoreszierende Zellen (Leervektor) und Reihe B als Referenzstamm für heterogene Phänotypen mit fluoreszierenden (grüner Bereich) und nicht-fluoreszierenden (grauer Bereich) *B. megaterium*-Zellen. Alle Messungen wurden als biologische Duplikate wiederholt und zeigten die gleiche Tendenz der Verteilung. Gezeigt sind die Ergebnisse aus einer Messung.

Reihe A: DSM319 transformiert mit pMM1520 (**Leervektor**)

Reihe B: DSM319 transformiert mit pSSBm85 (**Referenzstamm**)

Reihe C: WH321 ($\Delta xyIR$) transformiert mit pKMMBm5 (P_{xyIA}^{opt} -**gfp**, $\Delta xyIR$)

Abb. 30 zeigt, dass *B. megaterium* WH321 transformiert mit pKMMBm5 (*xyIR*-Mutante, Reihe C) wieder zu ähnlich heterogenen Phänotypen wie DSM319 transformiert mit pSSBm85 (Referenzstamm, Reihe B) führte. Beide Stämme zeigten zwei Stunden nach Induktion einen bistabilen Phänotyp durch zwei Peaks im Histogramm mit nicht-fluoreszierenden (grauer Bereich) und fluoreszierenden Zellen (grüner Bereich). Dabei lag der Anteil an fluoreszierenden Zellen (grüner Bereich) aus der Messung von Reihe B und C bei 62,7 und 78,4 % (2 h nach Induktion), 77,5 und 89,0 % (4 h nach Induktion), 88,0 und 88,9 % (6 h nach Induktion) und 90,9 und

81,9 % (8 h nach Induktion). Zwei bis sechs Stunden nach Induktion zeigte dabei der Referenzstamm die wenigsten Gfp-produzierenden Zellen während dieser acht Stunden nach Induktion die meisten Gfp-Produzierer zeigte.

Aus dieser Analyse wurde geschlossen, dass der Repressor bzw. ein mögliches Ungleichgewicht zwischen Induktor und Repressor eine untergeordnete Bedeutung für die phänotypische Heterogenität darstellte bzw. nicht als einzige Ursache betrachtet werden kann.

4.2.3 Ungleiche Verteilung von Zellkomponenten während der Zellteilung als Ursache für phänotypische Heterogenität

Die ungleiche Verteilung von Zellkomponenten wie Plasmiden und Proteinen auf die Tochterzellen stellt eine häufige Ursache für phänotypische Heterogenität dar. In der Literatur sind verschiedene Gründe für diese ungleiche Verteilung angegeben, wie etwa stochastische Effekte (Jahn *et al.*, 2015) oder auch das Alter der Zellpole (Lindner *et al.*, 2008; Boehm *et al.*, 2016).

Bei der Verteilung von Plasmiden kann ein stochastischer Effekt durch die Plasmidkopienzahl beeinflusst werden, da die Plasmide während der Zellteilung in der Regel zufällig auf die Tochterzellen verteilt werden. Je höher die Kopienzahl, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Tochterzellen zumindest ein Plasmid enthalten oder im Idealfall die Plasmide gleichmäßig verteilt werden (Friebs, 2004). Der *B. megaterium*-Stamm DSM319 transformiert mit pSSBm85, der einen deutlich heterogenen Phänotypen während der rekombinanten Gfp-Produktion zeigte (Münch *et al.*, 2015), basiert auf dem Plasmid pBC16 mit dem Replikationsursprung *oriU* aus *B. cereus*. Analysen in dieser Arbeit ergaben eine PCN von ca. 50 (Kapitel 4.2.2.2). Damit fällt das verwendete Plasmid unter die high-copy Plasmide (Mayer, 1995), so dass der Aspekt der zufälligen Unverteilung durch eine zu niedrige Kopienzahl eine untergeordnete Rolle spielte. Auch die Verwendung von anderen Replikationsursprüngen, die möglicherweise eine bessere Plasmidstabilität bzw. Verteilung vermitteln könnten, zeigte keinen Einfluss (Kapitel 4.2.2.2).

Eine ungleiche Verteilung von Zellkomponenten wurde auch in Verbindung mit dem Alter der Zellpole diskutiert (Lindner *et al.*, 2008; Winkler *et al.*, 2010; Boehm *et al.*, 2016). Nach jeder Zellteilung wird ein neuer Zellpol an der Teilungsebene geformt (Abb. 8). Ein Zellpol altert somit mit jeder Zellteilung, so dass in Bakterien-Populationen bestimmte Altersstrukturen vorhanden sind (Charlesworth, 1994). Es ist

beschrieben, dass sich Proteine (Glykogen oder Proteinaggregate) bevorzugt in Zellen mit den älteren Zellpolen einer Population häuften (Lindner *et al.*, 2008; Winkler *et al.*, 2010; Boehm *et al.*, 2016).

4.2.3.1 Analyse und Einfluss der ungleichen Plasmidverteilung durch instabiles Gfp mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

Für die Analyse der ungleichen Verteilung von Plasmiden wurde das *gfp*-Gen des Expressionsplasmids pSSBm85 gegen ein instabiles *egfp-LVA*-Gen ausgetauscht, wodurch das Plasmid pSWBm21 entstand. Das instabile Gfp-LVA ist nur wenige Minuten stabil, so dass es in der Zelle nur da lokalisiert werden kann, wo das Gen zeitnah exprimiert wird. Der LVA-Tag steht für eine kurze Peptidsequenz (AANDENYALVA), die an den C-Terminus der Gfp-Polypeptidkette fusioniert wurde. Der Tag führt innerhalb von wenigen Minuten ($\sim < 40$ min) zum Abbau des Proteins durch in der Zelle vorkommende intrazelluläre Proteasen (Andersen *et al.*, 1998).

Die rekombinante GFP-LVA-Produktion mit diesem neuen Plasmidstamm wurde in BioLector-Kultivierungen bestätigt (Abb. 41, im Anhang). Die maximale relative Fluoreszenz pro Zelle betrug dabei etwa nur 3,1 % im Vergleich zum Referenzstamm DSM319 transformiert mit pSSBm85. Nach der Beobachtung dieses geringen Gfp-Maximums wurde der CAI-Wert (codon adaption index) des *egfp-LVA* (aus pSWBm21) und des standardmäßig verwendeten *gfp* (aus pSSBm85) überprüft und verglichen (www.jcat.de). Der CAI-Wert ist eine Maßzahl und steht für die Expressionsstärke eines Gens, wobei der Wert ≤ 1 betragen kann (Sharp & Li, 1987). Ein CAI von 1 steht dabei für eine ideale Expressionsstärke. Stark exprimierte Gene bestehen aus den Codons der entsprechenden am häufigsten vorkommenden tRNAs. Weicht die Codonzusammensetzung eines heterologen Gens, wie zum Beispiel *egfp-LVA*, zu stark ab, so kann sich dies in der Expressionsstärke bemerkbar machen. Der CAI des *egfp-LVA* betrug 0,48, der von *gfp* aus pSSBm85 0,43, so dass die schwache Gfp-Produktion von DSM319 transformiert mit pSWBm21 nicht im Zusammenhang mit einem zu geringen CAI stehen sollte. Die schwache Gfp-Produktion steht damit hauptsächlich im Zusammenhang mit dem Abbau durch Proteasen.

Als nächstes wurden Durchflusszytometrie-Analysen durchgeführt. Dafür wurden erneut wie beschrieben die Referenzstämme und DSM319 transformiert mit pSWBm21 ($P_{xyIA}^{opt.}$ -*egfp-LVA*) kultiviert, eine Nullprobe vermessen und induziert.

Zwei, vier, sechs und acht Stunden nach Induktion erfolgte die Probennahme. Als Referenz für nicht-fluoreszierende Zellen diente *B. megaterium* DSM319 transformiert mit pMM1520 (Leervektor) und als Referenzstamm DSM319 transformiert mit pSSBm85.

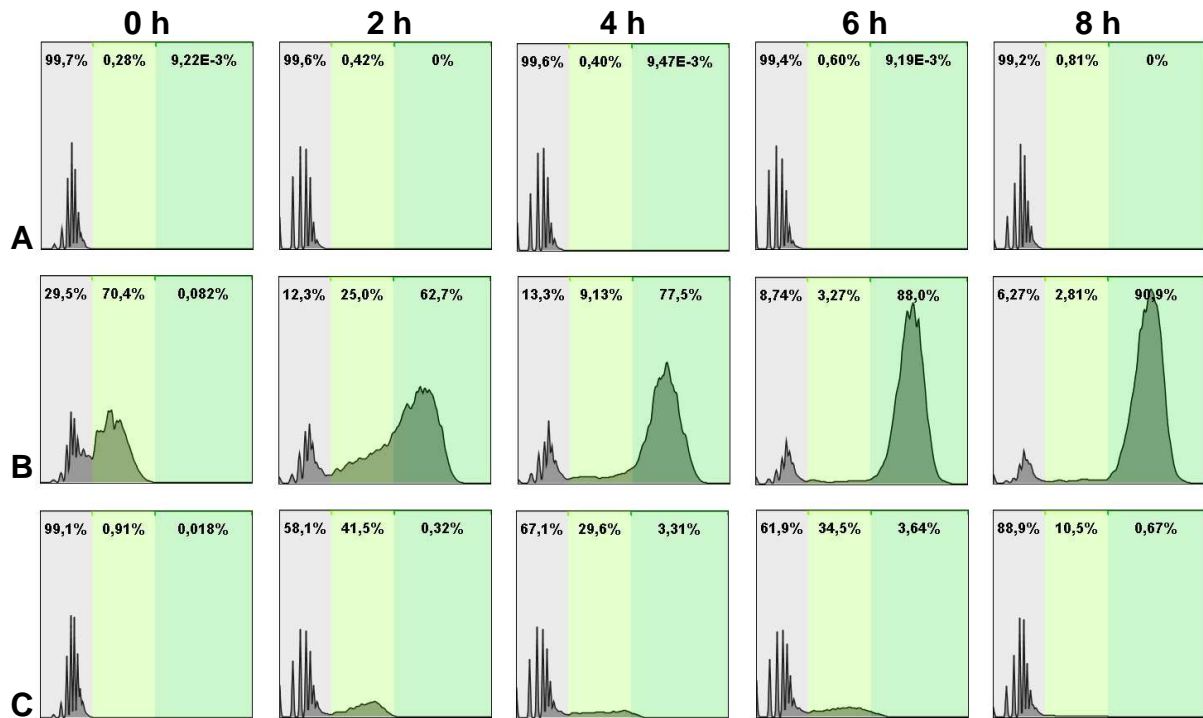


Abb. 31: Verteilung der Gfp-Fluoreszenz von *B. megaterium* Plasmid-Stämmen nach Durchflusszytometrie im Histogramm. Dargestellt ist die Verteilung von 10000 fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden *B. megaterium*-Zellen nach der Durchflusszytometrie von unterschiedlichen Stämmen und Messzeitpunkten (0 h, 2 h, 4 h und 8 h nach Induktion). Die Fluoreszenzintensität wurde gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen. Die drei unterschiedlichen farbigen Bereiche im Histogramm deuten auf nicht-fluoreszierende (grauer Bereich), wenig-fluoreszierende (hellgrüner Bereich) und fluoreszierende Zellen (grüner Bereich) hin. Reihe A diente als Referenz für nicht-fluoreszierende Zellen (Leervektor) und Reihe B als Referenzstamm für heterogene Phänotypen mit fluoreszierenden (grüner Bereich) und nicht-fluoreszierenden (grauer Bereich) *B. megaterium*-Zellen. Alle Messungen wurden als biologische Duplikate wiederholt und zeigten die gleiche Tendenz der Verteilung. Gezeigt sind die Ergebnisse aus einer Messung.

Reihe A: DSM319 transformiert mit pMM1520 (Leervektor)

Reihe B: DSM319 transformiert mit pSSBm85 (Referenzstamm)

Reihe C: DSM319 transformiert mit pSWBm21 (P_{xylA}^{opt} -*egfp-LVA*)

Abb. 31 zeigt, dass der *B. megaterium*-Stamm DSM319 transformiert mit pSWBm21 (Reihe C), der das instabile Gfp produzierte, zu einem deutlichen anderen Phänotyp führte als der Vergleichstamm DSM319 transformiert mit pSSBm85 (Reihe B). Der Hauptanteil der gezählten Zellen von DSM319 transformiert mit pSWBm21 zeigte nach der Induktion keine Fluoreszenz (grüner Bereich, Reihe C). Ungefähr ~ 70 % der gezählten Zellen lagen 2, 4, 6 und 8 Stunden nach Induktion im nicht-fluoreszierenden Bereich (grauer Bereich, Reihe C).

Diese Beobachtungen wurden auch durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bestätigt (Abb. 32) und stimmen mit der sehr geringen Gfp-Produktion im BioLector überein (Abb. 41, im Anhang).

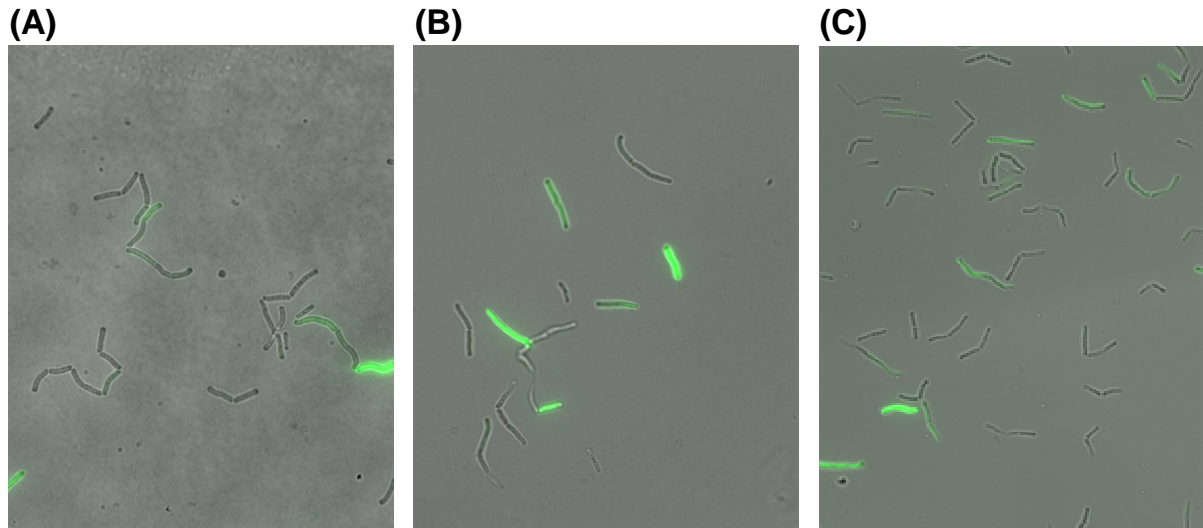


Abb. 32: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *B. megaterium* DSM319 transformiert mit pSWBm21 (P_{xylA}^{opt} -*egfp-LVA*). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen *B. megaterium*-Zellen während der Produktion von instabilen Gfp-LVA (A) 2, (B) 4 und (C) 6 h nach Induktion mit 0,5 % (w/v) Xylose. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Axiovert 200M Mikroskop (Carl Zeiss, Deutschland) bei einer 630-fachen Vergrößerung mit dem Filter-Set 38 (Carl Zeiss, Deutschland). Die aufgenommenen Bilder wurden mit dem Programm AxioVision Rel. 4.8 ausgewertet.

Abb. 32 zeigt, dass nur noch ein geringer Anteil (~ 20 %) der *B. megaterium*-Zellen fluoreszierte. Die Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie (Abb. 31) und den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen deuteten darauf hin, dass sich die Plasmide vermutlich ungleich während der Zellteilung auf die Tochterzellen verteilten, so dass die Zellen mehr oder weniger Plasmidkopien enthielten. In Zellen mit weniger Plasmiden wurde demnach auch eine geringe Menge des instabilen Gfp produziert, das durch die Proteasen abgebaut wurde, so dass keine detektierbare Fluoreszenz entstand. In den Zellen, die durch die ungleiche Verteilung mehr Plasmidkopien enthielten, entstand wahrscheinlich auch eine größere Menge an instabilem Gfp, die noch ausreichte, um die Fluoreszenz zu detektieren, bevor das Gfp durch Proteasen abgebaut wurde.

Es wurde vermutet, dass wie zuvor beschrieben (Kapitel 4.2.3), eine ungleiche Verteilung der Plasmide nicht durch stochastische Effekte auftrat, sondern wahrscheinlich durch einen anderen Mechanismus zustande kommen kann. Dieser Ansatz wurde folglich weiter analysiert.

4.2.3.2 Analyse und Einfluss der ungleichen XylR-Plasmid-Verteilung mittels Immunodetektion in fixierten *Bacillus megaterium*-Zellen

Nachdem die ersten Hinweise auf eine ungleiche Plasmidverteilung erhalten wurden (Kapitel 4.2.3.1), sollte auch die Verteilung des Xylose-Repressors in *B. megaterium* durch eine Lokalisation innerhalb der Zelle untersucht werden. Durch die Bindungsstudien des gereinigten Xylose-Repressors (Kapitel 4.1) war bereits bekannt, dass XylR in seiner aktiven und inaktiven Form an die Operatoren O_{xylR} und O_{xylA} , die sich auch auf den Expressionsplasmiden mit Xylose-induzierbaren Promotor befinden, binden konnte (Kapitel 4.1.6). Diese Eigenschaft macht eine Co-Lokalisation der Repressor-gebundenen Plasmide möglich. Die Lokalisation des XylR-Plasmid-Komplexes erfolgte in fixierten *B. megaterium*-Zellen durch Immunodetektion mittels generierter Anti-XylR-Antikörper. Die Generierung des monoklonalen Antikörpers gegen den Xylose-Repressor mit gebundener Xylose erfolgte durch die Firma „Antibody Facility“ (TU Braunschweig) und nach Kapitel 3.7.11.

Für die Analyse mittels Immunodetektion wurden Zellen aus einer induzierten *B. megaterium* DSM319 transformiert mit pSSBm85-Kultur fixiert und permeabilisiert, um sie für die Antikörper durchlässig zu machen. Danach wurden sie auf einen Objektträger aufgebracht und mit dem primären Anti-XylR-Antikörper sowie mit dem sekundären Anti-Maus-Antikörper (Alexa Fluor® 568) behandelt. Als Negativkontrolle diente die *B. megaterium xylR*-Deletionsmutante WH321 (Rygus & Hillen, 1992) transformiert mit pKMMBm5 (Münch *et al.*, 2015) (Kapitel 4.2.2.3).

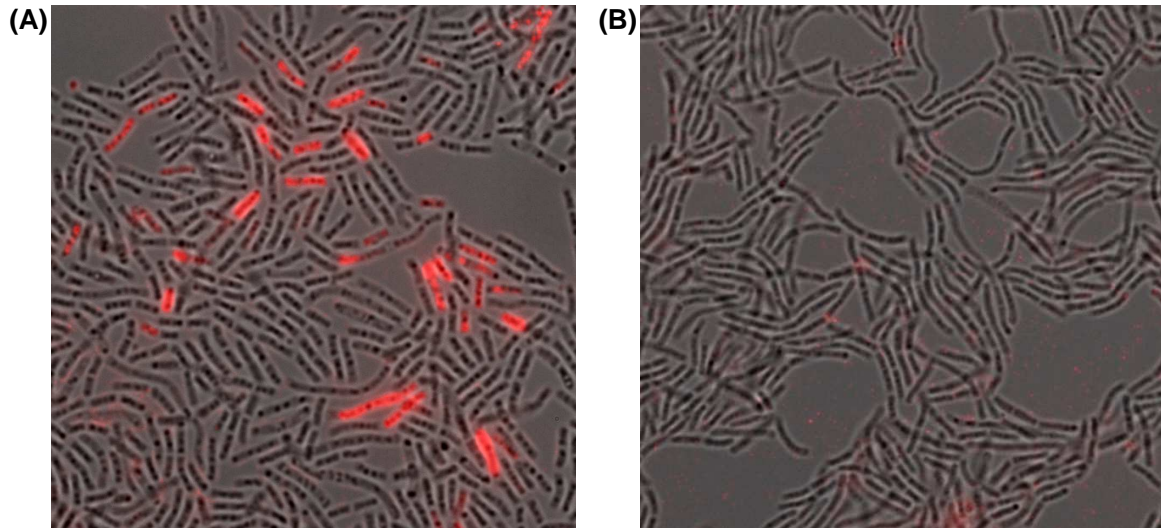


Abb. 33: Immunodetektion mit monoklonalen Antikörpern gegen XylR_{B.meg} in fixierten *B. megaterium*-Zellen. *B. megaterium* (A) DSM319 transformiert mit pSSBm85 und (B) WH321 ($\Delta xyIR$) transformiert mit pKMMBm5 ($\Delta xyIR$) wurden fixiert, permeabilisiert und auf einem Objektträger immobilisiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären monoklonalen Anti-XylR-Antikörper und darauf folgend mit dem sekundären Anti-Maus-Antikörper (Alexa Fluor® 568), der an einen roten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Die Aufnahmen erfolgten am Axiovert 200M Mikroskop unter Verwendung des Filter Sets 43 (Zeiss) mit 630-facher Vergrößerung. Die aufgenommenen Bilder wurden mit dem Programm AxioVision Rel. 4.8 ausgewertet.

Die Immunodetektionsanalyse in Abb. 33 A zeigt, dass nur ein geringer Anteil der *B. megaterium*-Zellen (DSM319 transformiert mit pSSBm85) fluoreszierte. Dieses Ergebnis könnte erneut darauf hindeuten, dass die Plasmide in den Zellen unterschiedlich verteilt sind. In Zellen mit einer hohen Plasmidkopienzahl kommt es auch zu einer ausreichend großen Anhäufung der Repressoren, die an O_{xyIR} und O_{xyIA} auf dem Plasmid binden, so dass XylR durch den Antikörper detektiert werden kann. In Zellen, die durch die ungleichmäßige Verteilung eine geringe Plasmidmenge erhalten, befindet sich vermutlich demnach auch eine geringere Anhäufung des Repressors. Das Plasmid pSSBm85 besitzt zwei XylR-Bindestellen (O_{xyIR} und O_{xyIA}), so dass eine geringe Plasmidkopienzahl vermutlich nicht zu einer ausreichenden Akkumulation des Plasmid-gebundenen Repressors führte, um diesen durch Antikörper detektieren zu können. Die Negativkontrolle der *xyIR*-Mutante (WH321 transformiert mit pKMMBm5) in Abb. 33 B fluoreszierte hingegen nicht und zeigte so, dass die generierten monoklonalen Antikörper spezifisch gegen XylR waren.

Da nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, ob alle Zellen ausreichend und gleichmäßig permeabilisiert wurden und somit für die Antikörper gleichmäßig zugänglich waren, stellte dieses Ergebnis über die ungleiche Plasmid-Verteilung wieder einen weiteren Hinweis dar.

Ergebnisse aus vorherigen Arbeiten wiesen ebenfalls auf eine ungleiche XylR-Plasmid-Verteilung über die Visualisierung eines XylR-mCherry Fusionproteins hin. Münch *et al.* zeigten dabei mittels Time lapse-Aufnahmen, dass der Xylose-induzierte *B. megaterium*-Plasmidstamm mCherry-bedingt rot fluoreszierende Zellspitzen entwickelte, die ebenfalls auf eine ungleiche Verteilung von XylR-mCherry-Plasmid-Komplexen schließen ließen (Münch *et al.*, 2015).

4.2.3.3 Analyse und Einfluss der ungleichen Plasmidverteilung mittels Time lapse

Nachdem die vorherigen Analysen Hinweise auf eine ungleichmäßige Plasmidverteilung gaben, sollte die phänotypische Heterogenität während des Zellwachstums mikroskopisch verfolgt werden. Dazu wurden fluoreszenzmikroskopische Bilder von sich teilenden *B. megaterium*-Zellen DSM319 transformiert mit pSSBm85 in sehr kurzen Zeitabständen (alle fünf Minuten) automatisch aufgenommen, die final nacheinander und in einer beliebigen Geschwindigkeit abgespielt werden können („time lapse“). Mit Hilfe dieser Aufnahmen konnte ein heterogener Phänotyp detailliert analysiert werden, um durch die fluoreszierenden und nicht-fluoreszierende Zellen mehr Informationen über eine mögliche ungleiche Plasmidverteilung zu gewinnen.

Für die Time lapse-Aufnahmen wurde eine A5+4-ü.N.-Kultur kultiviert und darauf folgend eine A5+4-Hauptkultur angeimpft, die bis zu einer OD_{578 nm} von 0,3 inkubiert wurde. Ausgehen davon wurde 1 µL dieser Kultur auf ein kleines A5+4-Agar-Pad mit 0,5 % (w/v) Xylose pipettiert und in eine Mini-Petrischale überführt, die im zugehörigem Mikroskop-Inkubator auf 37 °C gewärmt wurde. Die Aufnahme der fluoreszenzmikroskopischen Bilder erfolgte in fünfminütigen Abständen für sechs Stunden.

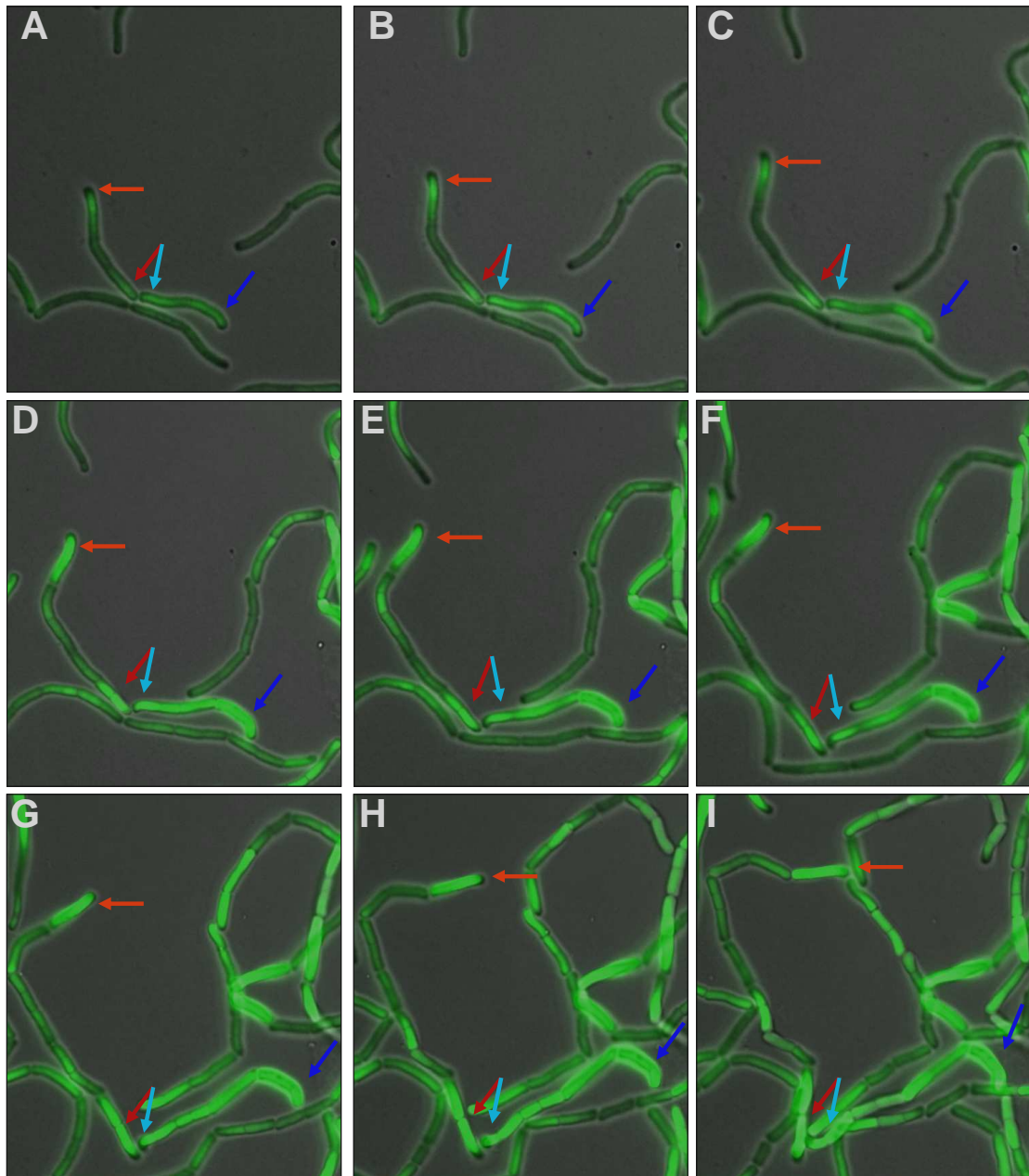


Abb. 34: Fluoreszenz-Time lapse-Mikroskopie von Gfp-produzierenden *B. megaterium*-Zellen. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von DSM319 transformiert mit pSSBm85 wurden (A) 30, (B) 55, (C) 80, (D) 105, (E) 130, (F) 155, (G) 180, (H) 205 und (I) 230 min nachdem die Kultur auf das Xylose-haltige Agar-Pad gebracht wurde, aufgenommen. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten in fünfminütigen Abständen für 6 h bei 37 °C. Die roten und blauen Pfeile kennzeichnen jeweils die endständigen Zellen zweier Stäbchenketten.

In den Bildanalysen der einzelnen Bilder aus der Time lapse-Mikroskopie ist deutlich ein Muster zu erkennen, in dem sich stark fluoreszierende Zellen vermehrt am Ende der Stäbchenkette befinden (Abb. 34, Pfeile). Einzelnd ist auch zu beobachten, dass die letzte Zelle einer Kette eine „sichelartige“ Form annimmt und am stärksten fluoresziert (Abb. 34, dunkelblauer Pfeil). Durch dieses auffällige und immer wieder auftretende Verteilungsmuster der fluoreszierenden Zellen wurde vermutet, dass die Plasmide nicht zufällig ungleich auf die Tochterzellen verteilt werden, sondern nach

einem bestimmten Mechanismus. Diese Ergebnisse wurden in Kooperation mit Richard Münch erzielt (Münch *et al.*, 2015).

Es wird vermutet, dass die Plasmide bei jeder Zellteilung vermehrt auf Zellen mit älteren Zellpolen verteilt werden und die Zellen mit jüngeren Zellpolen so weniger Plasmidkopien enthalten. Die Entstehung von phänotypischen Unterschieden in einer Population in Abhängigkeit von dem Zellpolalter wurde bereits beschrieben (Lindner *et al.*, 2008; Winkler *et al.*, 2010; Bergmiller & Ackermann, 2011; Boehm *et al.*, 2016). Nach einem Modell über die Entstehung von Zellen mit neuen und alten Zellpolen befinden sich die Zellen mit älteren Polen am Ende der Stäbchenkette (Abb. 35).

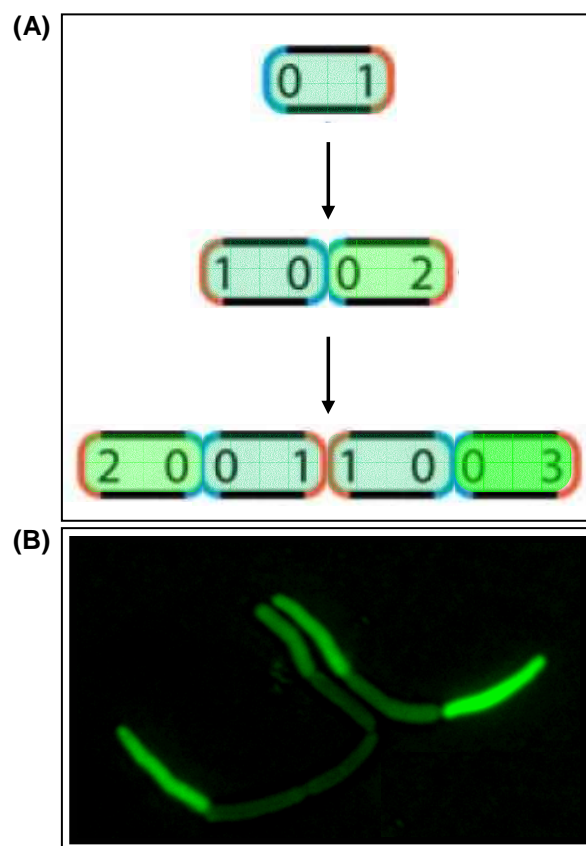


Abb. 35: (A) Schematische Darstellung einer fluoreszierenden *B. megaterium*-Stäbchenkette nach ungleicher Plasmidverteilung zwischen Zellen mit alten (rot) und neuen (blau) Zellpolen und (B) die entsprechende mikroskopische Darstellung zweier Gfp-produzierender *B. megaterium*-Stäbchenkette aus einer Time lapse-Aufnahme von DSM319 transformiert mit pSSBm85. (A) Während jeder Zellteilung entsteht ein neuer Zellpol (blau) an der Teilungsebene. Der ältere Zellpol (rot) geht aus der vorherigen Zellteilung hervor. Die Nummern in den Polen gibt die Anzahl der Zellteilungen an, die der entsprechende Pol bereits durchgezogen hat. Das Zellalter der Ausgangszelle und welcher der beiden Pole der ältere Pol ist, ist unbekannt und wird schematisch mit „1“ bezeichnet ((A) verändert nach Stewart *et al.*, 2005). (A, B) Zellen mit älteren Zellpolen behalten vermutlich bei jeder Zellteilung mehr Plasmidkopien, was dazu führt, dass das *gfp*-Gen in einer hohen Kopienzahl vorliegt und dementsprechend stärker exprimiert wird. Dies führt zu unterschiedlicher Fluoreszenzintensität zwischen den Zellen und zu einer starken Fluoreszenz endständiger Zellen, da diese den ältesten Zellpol besitzen. Die unterschiedlich intensiv grünen Zellen stellen die unterschiedliche Gfp-Fluoreszenz durch eine ungleiche Plasmidverteilung dar.

Abb. 35 A zeigt schematisch die mögliche Ursache für den heterogenen Phänotyp von *B. megaterium* während der rekombinanten Gfp-Produktion (Abb. 35 B). Es wird vermutet, dass die ungleiche Verteilung der Plasmide einem bestimmten Mechanismus folgt, da beobachtet werden konnte, dass sich die stark-fluoreszierenden Zellen vermehrt am Ende der Stäbchenkette befinden. Demnach erhalten Zellen mit älteren Polen bei jeder Zellteilung mehr Plasmidkopien. Werden Zellen mit älteren Zellpolen bei der Plasmidverteilung bevorzugt, liegt auch dort das *gfp*-Gen in einer hohen Kopienzahl vor und wird dementsprechend exprimiert. Dies führt zu unterschiedlicher Fluoreszenz zwischen den Zellen und zu einer starken Fluoreszenz endständiger Zellen, da diese den ältesten Zellpol besitzen. Bisher konnte nicht geklärt werden, wie und warum Bakterien die Altersstruktur der Population für die Entstehung heterogener Phänotypen zu nutzen scheinen (Boehm *et al.*, 2016).

Der Mechanismus der unterschiedlichen Plasmidverteilung in Abhängigkeit des Alters der Zellpole stellt einen starren Prozess dar, der für jeden *B. megaterium*-Stamm und jede Kultivierung ähnlich ist. Demzufolge kann daraus auch die immer wieder auftretende ähnliche Verteilung von fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zellen während der Durchflusszytometrie begründet werden. Obwohl unterschiedliche *B. megaterium*-Mutanten (*xyIT*-Mutante (4.2.1.1), *xyIR*-Mutante (4.2.2.3)), unterschiedliche *B. megaterium*-Plasmidstämme (Expressionssystem mit unterschiedlichen Replikationsursprüngen (4.2.2.2), mit konstitutivem Promotor (4.2.1.1)) und Kultivierungsbedingungen (unterschiedliche Xylosekonzentration (4.2.2.1)) verwendet wurden, zeigten immer 70 - 90 % der Zellen eine starke Fluoreszenz.

In Kapitel 4.2 wurde bereits beschrieben, dass die nicht-fluoreszierenden Zellen nicht durch Plasmidverlust bedingt sind, sondern vermutlich eine sehr geringe Plasmidkopienzahl enthalten, so dass das rekombinante *gfp* nicht ausreichend exprimiert werden kann, um im Folgenden Gfp zu detektieren. Nicht-fluoreszierende Zellen spalten sich nach erneuter Kultivierung wieder in Subpopulationen von nicht- und fluoreszierenden Zellen im ähnlichen Verhältnis von 7:3 auf (Kapitel 4.2). Auch dieses Verhalten kann durch eine ungleiche Plasmidverteilung auf Zellen mit neuen und alten Zellpolen erklärt werden. Auch die wenigen Plasmide in den nicht-fluoreszierenden Zellen werden vermutlich wieder ungleich auf Zellen mit neuen und alten Zellpolen verteilt, repliziert und ergeben erneut heterogene Phänotypen.

Die Regulation der unterschiedlichen Verteilung der Plasmide wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert. Es wird jedoch vermutet, dass die Anhäufung in alten Zellen den Bakterien einen Vorteil verschafft. Durch die unterschiedliche Plasmidverteilung entstehen Zellen in einer Population, die unterschiedliche Plasmidkopienzahl enthalten. Zellen mit hoher Plasmidkopienzahl wären nach dieser Hypothese vermutlich an schnell wechselnde Bedingungen, wie Antibiotika-Zugabe, besser angepasst, da sich oft Resistenzgene auf rekombinanten Plasmiden befinden. Der Nachteil einer hohen Plasmidkopienzahl und der damit verbundenen hohen *gfp*-Expression ist die Belastung des Organismus durch die hohe rekombinante Proteinproduktion. In diesem Zusammenhang konnte bereits beobachtet werden, dass sich die stark-fluoreszierenden Zellen langsamer oder gar nicht mehr teilten (Münch *et al.*, 2015). Im Gegensatz dazu ist eine niedrige Plasmidkopienzahl eine geringere Belastung für den Organismus, da die rekombinante Expression (Zielgen, Replikation, Antibiotikaresistenz) stark reduziert ist. Nicht-fluoreszierende Zellen zeigen in Time lapse-Aufnahmen eine wesentlich schnellere Teilung als stark-fluoreszierende Zellen (Münch *et al.*, 2015). Allerdings kann eine geringere Plasmidkopienzahl auch eine schlechtere Anpassung an sich schnell wechselnde Umweltbedingungen darstellen. Diese Strategie, bei der sich genetisch identische Bakterien phänotypisch unterscheiden, um an die wechselnden Bedingungen besser angepasst zu sein, wird in der Literatur auch als „bet-hedging“ bezeichnet (Beaumont *et al.*, 2009; Levy, 2016).

Ergänzend zu dieser Vermutung der ungleichen Plasmidverteilung stehen Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)-Analysen, bei denen Plasmid-DNA durch eine mit Fluoreszenzfarbstoff markierte komplementäre Sonde in der Zelle lokalisiert werden kann (Münch *et al.*, 2015). Die Xylose-induzierten Zellen zeigten, dass die rekombinanten Plasmide vermehrt an einem der beiden Zellpole lokalisiert sind und nicht gleichmäßig im Zytoplasma verteilt sind. Daraus wurde bereits vermutet, dass es bei der Zellteilung zu einer ungleichen Verteilung der Plasmide auf die Tochterzelle kommen kann. Außerdem wurde durch die FISH-Analysen gezeigt, dass sich die Plasmide scheinbar nur nach Induktion bzw. während der rekombinanten Proteinproduktion ungleichmäßig in der Zelle verteilen (Münch *et al.*, 2015). Diese Beobachtung bestätigt die hier aufgestellte Hypothese, dass die ungleiche Plasmidverteilung während der rekombinanten Proteinproduktion einen Vorteil für das Bakterium schafft.

4.2.3.4 Analyse und Einfluss eines Plasmid-freien Systems durch genomische *gfp*-Integration mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

Nachdem festgestellt wurde, dass die Ursache der phänotypischen Heterogenität in *B. megaterium* im Zusammenhang mit der ungleichen Plasmidverteilung zu stehen scheint, wurde final ein äquivalentes Plasmid-freies System in *B. subtilis* analysiert. Die Konstruktion eines solchen Systems in *B. megaterium* gelang in dieser Arbeit nicht. Dieses System sollte die phänotypische Heterogenität aufheben, um eine ungleiche Plasmidverteilung als Ursache zu bestätigen. Hierfür wurde die *B. subtilis*-Mutante JH642 verwendet, die im Genom eine $P_{xylA} \text{ } B.\textit{sub}$ -*gfp* Integration trägt (persönliche Gabe, E. Härtig, TU Braunschweig).

Die rekombinante Gfp-Produktion wurde in BioLector-Experimenten gezeigt (Abb. 42, im Anhang). Dabei fiel auf, dass der Stamm vor Induktion kein Gfp produzierte, was darauf hindeutete, dass die einzige *xylR*-Genkopie im Genom vom *B. subtilis*, die für den Xylose-Repressor codiert, ausreichte, um das System zu reprimieren. Somit war das hier verwendete System in *B. subtilis* in Bezug auf die benötigte Induktion für die *gfp*-Expression vergleichbar mit dem Xylose-induzierbaren Plasmid-basierten Referenzsystem pSSBm85. Die maximale relative Fluoreszenz pro Zelle wurde nach 17 Stunden erreicht. Sie lag bei etwa 7,3 % im Vergleich zum Maximum des Referenzstamms DSM319 transformiert mit pSSBm85. Bei letzterem lag das Maximum auch bereits sechs Stunden nach Inokulation vor. Die geringe Gfp-Produktion in *B. subtilis* kann dadurch begründet werden, dass das *gfp*-Gen nur als Einzelkopie im Genom vorlag.

Im Folgenden wurden wie bereits beschrieben Durchflussanalysen mit dem rekombinanten *B. subtilis*-Stamm durchgeführt. Als Referenzstämme dienten *B. megaterium* DSM319 transformiert mit pMM1520 (Leervektor) und DSM319 transformiert mit pSSBm85.

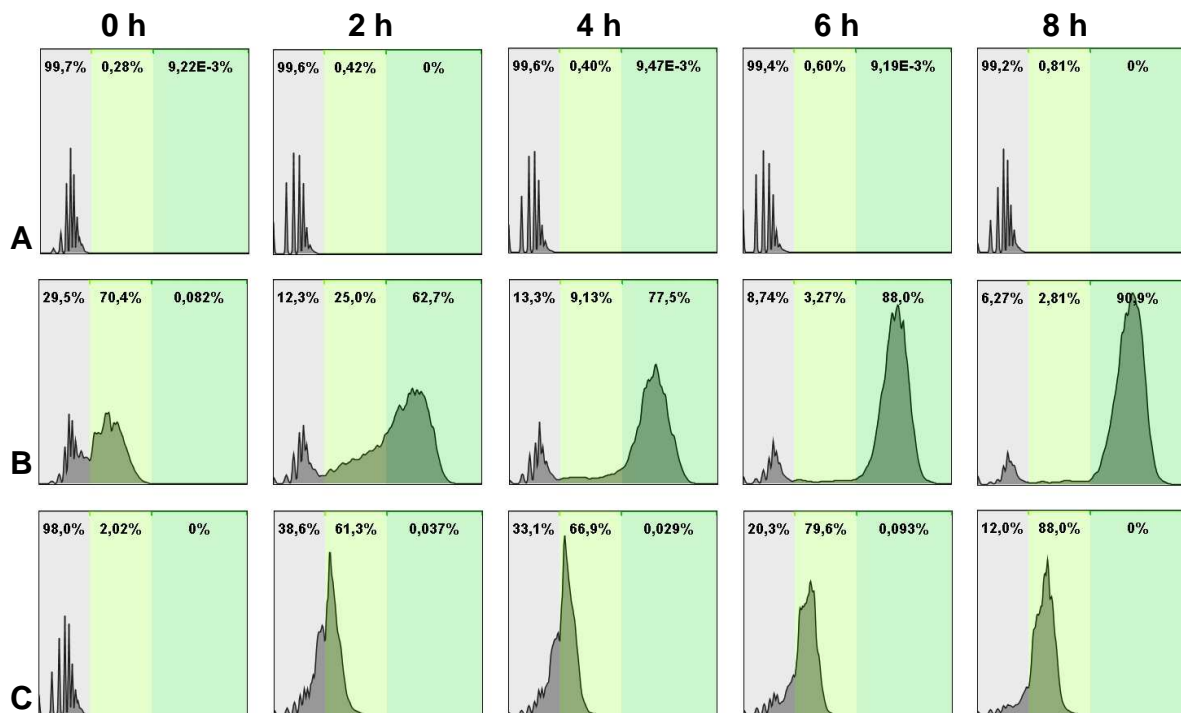


Abb. 36: Verteilung der Gfp-Fluoreszenz von *B. megaterium* Plasmid-Stämmen und *B. subtilis* nach Durchflusszytometrie im Histogramm. Dargestellt ist die Verteilung von 10000 fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zellen nach der Durchflusszytometrie von unterschiedlichen Stämmen und Messzeitpunkten (0 h, 2 h, 4 h und 8 h nach Induktion). Die Fluoreszenzintensität wurde gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen. Die drei unterschiedlichen farbigen Bereiche im Histogramm deuten auf nicht-fluoreszierende (grauer Bereich), wenig-fluoreszierende (hellgrüner Bereich) und fluoreszierende Zellen (grüner Bereich) hin. Reihe A diente als Referenz für nicht-fluoreszierende Zellen (Leervektor) und Reihe B als Referenzstamm für heterogene Phänotypen mit fluoreszierenden (grüner Bereich) und nicht-fluoreszierenden (grauer Bereich) *B. megaterium*-Zellen. Alle Messungen wurden als biologische Duplikate wiederholt und zeigten die gleiche Tendenz der Verteilung. Gezeigt sind die Ergebnisse aus einer Messung.

Reihe A: DSM319 transformiert mit pMM1520 (**Leervektor**)

Reihe B: DSM319 transformiert mit pSSBm85 (**Referenzstamm**)

Reihe C: *B. subtilis* JH642 (***amyE::P_{xyIA}-gfp***)

Abb. 36 zeigt, dass die Plasmid-freie *B. subtilis*-Variante (Reihe C) kein bistabiles Verhalten wie der Referenzstamm DSM319 transformiert mit pSSBm85 (Reihe B) hervorbrachte. DSM319 transformiert mit pSSBm85 zeigte zwei Stunden nach Induktion einen bistabilen Phänotyp durch zwei Peaks im Histogramm mit nicht-fluoreszierenden (grauer Bereich) und fluoreszierenden Zellen (grüner Bereich). Die Plasmid-freie *B. subtilis*-Variante zeigt hingegen über den gesamten Zeitraum ein stabiles Verhalten mit nur einem Peak, der eine vergleichsweise schmale Peak-Basislinie besitzt, was die geringe Variation der Fluoreszenz darstellte. Das Auftreten der geringen Variation der Fluoreszenz, liegt vermutlich an dem natürlichen Rauschen in der rekombinanten *gfp*-Expression (Kapitel 1.5.1.1). Zusätzlich wurde in diesem Zusammenhang auch getestet, ob die phänotypische Heterogenität während der rekombinanten Gfp-Produktion ein *B. megaterium*-spezifisches Problem

darstellte und daher nicht in *B. subtilis* auftrat. Dafür wurde *B. subtilis* 168 transformiert mit pSSBm85 mittels Durchflusszytometrie wie bereits beschrieben analysiert, wobei wieder ein bistabiler Phänotyp durch zwei Peaks (~25 % weiße und ~75 % grüne Zellen) im Histogramm zu erkennen war (Histogramme nicht gezeigt).

Die Ergebnisse deuten final darauf hin, dass die phänotypische Heterogenität im Zusammenhang mit einer ungleichen Plasmidverteilung und weniger in Verbindung mit der autokatalytischen Genexpression eines Transporters (Kapitel 4.2.1) oder dem Repressor-Induktor Ungleichgewicht durch high-copy Plasmide (Kapitel 4.2.2) steht. Auch in vorherigen Versuchen zur phänotypischen Kulturheterogenität in *B. megaterium* wurde bereits eine Plasmidunverteilung vermutet (Münch *et al.*, 2015). Durch qRT-PCR-Analysen von sortierten fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden *B. megaterium*-Zellen wurde das Verhältnis der mRNA-Menge der *xyIR*-, *gfp*- und *xyIT*-Gene untersucht. Die Analysen zeigten, dass die mRNA-Menge von *xyIR* und *gfp* in den fluoreszierenden Zellen um das 150- bzw. 500-fache höher war, wohingegen die mRNA-Menge von *xyIT* im Verhältnis gleich blieb (Münch *et al.*, 2015). Die deutlich höhere *gfp*- und *xyIR*-Expression der starken Gfp-Produzierer bzw. fluoreszierenden Zellen wurde mit einer erhöhten Anzahl dieser Gene begründet und folgend auf eine ungleiche Plasmidverteilung geschlossen. Die mRNA-Menge des transkribierten *xyIT*-Gens blieb hingegen in allen Zellen unverändert und führte zu der Annahme, dass die heterogenen Phänotypen unabhängig von XylT entstanden. Diese Beobachtung korrelierte auch mit den vorliegenden Ergebnissen, die zeigten, dass die fehlende autokatalytische Genexpression des Transporters und auch die *xyIT*-Mutante die phänotypische Heterogenität nicht beeinflusste (Kapitel 4.2.1.1).

Final zeigten Time lapse-Aufnahmen ein charakteristisches Verteilungsmuster, in dem vorallem endständige Zellen einer Kette grün fluoreszierten (Abb. 34). Dies ließ vermuten, dass bei einer ungleichen Plasmidverteilung Zellen mit älteren Zellpolen bei jeder Zellteilung mehr Plasmidkopien als die Zellen mit jüngeren Zellpolen erhalten. Nachdem die mögliche Ursache analysiert wurde, könnten Ansätze gefunden werden, um rekombinante Plasmide gleichmäßiger zu verteilen und so die phänotypische Heterogenität aufzuheben. Hierfür könnte die Verwendung von *parA/B*-Systemen, die die Plasmide aktiv auf die Tochterzellen verteilen oder Toxin-/Antitoxin-Systemen, die das Vorhandensein von Plasmid-freien oder -armen Zellen verhindern, zum Einsatz kommen (Kapitel 1.5.1.2).

Die Steigerung der rekombinanten Proteinproduktion (in diesem Fall Gfp) von 30 % ist aber vermutlich so nicht umzusetzen. Es wird vermutet, dass bei einer gleichmäßigeren Verteilung der Plasmide diese lediglich umverteilt würden, so dass keine gesteigerte *gfp*-Genexpression stattfinden würde, da die *gfp*-Menge gleich bliebe.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Seit vielen Jahren wird *Bacillus megaterium* für die Produktion von rekombinanten Proteinen als Alternative zum etablierten *Escherichia coli* genutzt. Dafür wird bislang hauptsächlich das für *B. megaterium* optimierte Xylose-induzierbare Promotorsystem genutzt. Für die Regulation dieses Systems wird bislang angenommen, dass das Repressorprotein XylR in Abwesenheit von Xylose (reprimierter Zustand) an einen entsprechenden Operator an die DNA bindet und so die Transkription verhindert, während sich XylR bei Anwesenheit von Xylose (exprimierter Zustand) von der DNA löst und die Transkription ermöglicht.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Repressor XylR_{B.meg} erfolgreich gereinigt. Damit konnte durch DNA-Bindestudien in An- und Abwesenheit von Xylose erstmals gezeigt werden, dass beide Repressor-Formen (+/- Xylose) an den gleichen Operator binden. Allerdings werden beide Formen unterschiedlich oligomerisiert, sodass die DNA der Promotorregion in Abhängigkeit der gebundenen Repressor-Form unterschiedlich organisiert wird. Mit Hilfe von Footprint-Analysen wurde die Hypothese bestätigt, dass der Xylose-freie Repressor Loop-ähnliche DNA-Strukturen ausbildet, die zur Reprimierung der Transkription führen. Das bestehende Modell der XylR-vermittelten Regulation muss also entsprechend angepasst werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden mögliche Ursachen für die Ausbildung einer phänotypischen Heterogenität während der rekombinanten Proteinproduktion untersucht. Hierfür wurden verschiedene *B. megaterium*-Mutanten und *B. megaterium* mit Plasmiden unterschiedlichem Replikationsursprungs getestet. Dabei wurde Gfp als Modellprotein genutzt. Der Einfluss der Expression des Xylose-Transportergens, des Repressor-Induktor Verhältnis bei der Nutzung von Plasmiden hoher Kopienzahlen und die Verteilung von Zellkomponenten während der Zellteilung sollten so bestimmt werden. Durch Fluoreszenz-Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie Gfp-produzierender *B. megaterium*-Zellen wurde festgestellt, dass die phänotypische Heterogenität während der rekombinanten Gfp-Produktion im Zusammenhang mit einer ungleichen Plasmidverteilung steht. Dabei erhalten die Zellen mit älteren Zellpolen nach jeder Zellteilung mehr Plasmidkopien als die Zellen mit jüngeren Zellpolen, um durch sogenanntes „Bet-hedging“ Vorteile bei sich wechselnden Umweltbedingungen zu haben.

6. SUMMARY

Since many years, *Bacillus megaterium* is used for the production and secretion of recombinant proteins as an alternative host to the well-characterized *Escherichia coli*. For this purpose, an optimized xylose-inducible expression system was usually employed. It was postulated that in the absence of xylose the xylose repressor XylR binds to the operator and prevents expression of the following genes. In the presence of xylose XylR binds the sugar, which induces a structural rearrangement responsible for the loss of affinity of XylR for its DNA target and induction of gene expression. So far, no experimental evidence exists for this model, since the DNA-binding behaviour of XylR was not analysed.

In the first part of this work the xylose repressor was recombinantly produced and successfully purified. *In vitro* DNA-binding studies showed that XylR with and also without bound xylose binds to the same operator O_{xylA} . However, both forms of XylR (+/- Xylose) revealed different states of oligomerization, which resulted in a different structural organization of the bound operator DNA. Footprint analyses confirmed the hypothesis, that the xylose-free XylR forms DNA-loop structures causing repression of gene expression. The failure of the DNA bound xylose containing XylR to form these structure allows for gene expression. Based on all results, the postulated model of XylR-DNA binding needs to be adapted.

Utilization of the plamid-based xylose-inducible expression system leads to phenotypic heterogeneity during the recombinant protein production. Hence, in the second part of this work the molecular basis for phenotypic heterogeneity was analysed. For this purpose, *B. megaterium* mutants were tested with plasmids carrying different origins of replication. Gfp served as model protein. The influence of xylose transporter gene expression, imbalanced repressor-inducer equilibrium due to the utilization of high copy plasmids and unequal distribution of cell components during cell division were analyzed. Gfp quantification via fluorescence flow cytometry and fluorescence microscopy demonstrated that phenotypic heterogeneity is due to an unequal distribution of plasmids during cell division. The cells harboring an older cell pole receive more plasmid copies after each cell division compared to the cells derived from the younger cell pole. It is assumed that bacteria use this so-called bet-hedging strategy to obtain advantages in a changing environments.

7. AUSBLICK

Die Ergebnisse des ersten Teils dieser Arbeit zeigen, dass das bestehende Modell zur XylR-vermittelten Regulation des Operons angepasst und genauer charakterisiert werden kann. Es wurde gezeigt, dass beide Repressor-Formen (mit und ohne Xylose) an den gleichen Operator O_{xylA} binden und unterschiedlich oligomerisiert sind. Für eine Bestätigung und Weiterentwicklung des neuen Modells sollte(n)

- die *in vitro*-Transkription der Repressor-gebundenen DNA in Anwesenheit von Xylose untersucht werden,
- der genaue Oligomerisierungsgrad von $XylR_{B.meg}$ (mit und ohne Xylose) mittels Gelpermeationschromatographie analysiert werden und
- die für die XylR-DNA-Bindung wichtigen Basen im Operator verändert werden, so dass auf eine spezifische Bindung in weiteren DNA-Bindestudien geschlossen werden kann und *in vivo* Analysen durchgeführt werden können.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die möglichen Ursachen für phänotypische Heterogenität mittels verschiedener Modelle untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die phänotypische Heterogenität im Zusammenhang mit einer ungleichen Plasmidverteilung während der Zellteilung steht und dass die Plasmide vermutlich bevorzugt auf Zellen mit älteren Zellpolen verteilt werden.

- Nachdem die Ursache analysiert wurde, könnte die Aufhebung der phänotypischen Heterogenität durch Verwendung von *parA/B*-Systemen, die die Plasmide aktiv auf die Tochterzellen verteilen oder durch die Nutzung eines plasmidbasierten Toxin-/Antitoxin-Systems erfolgen.
- Des Weiteren könnte die Generierung und Untersuchung von Mutanten, die zu einer reduzierten Zellteilung führen, Informationen über die Rolle des Zellpolalters in Bezug auf die phänotypische Heterogenität liefern.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Ackermann, M., Stecher, B., Freed, N. E., Songhet, P., Hardt, W.-D. & Doebeli, M. (2008).** Self-destructive cooperation mediated by phenotypic noise. *Nature*, 454(7207), 987–990.
- Andersen, J. B., Sternberg, C., Poulsen, L. K., Bjørn, S. P., Givskov, M. & Molin, S. (1998).** New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 64(6), 2240–2246.
- Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L. & Leibler, S. (2004).** Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, 305(5690), 1622–1625.
- Barak, R. & Eisenbach, M. (1996).** Regulation of interaction between signaling protein CheY and flagellar motor during bacterial chemotaxis. *Curr Top Cell Regul*, 34, 137–158.
- Beaumont, H. J. E., Gallie, J., Kost, C., Ferguson, G. C. & Rainey, P. B. (2009).** Experimental evolution of bet hedging. *Nature*, 462(7269), 90–93.
- Bentley, W. E. & Kompala, D. S. (1989).** A novel structured kinetic modeling approach for the analysis of plasmid instability in recombinant bacterial cultures. *Biotechnol Bioeng*, 33(1), 49–61.
- Benzer, S. (1953).** Induced synthesis of enzymes in bacteria analyzed at the cellular level. *Biochim Biophys Acta*, 11(3), 383–395.
- Bergmiller, T. & Ackermann, M. (2011).** Pole age affects cell size and the timing of cell division in *Methylobacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol*, 193(19), 5216–5221.
- Bernhard, K., Schrempf, H., & Goebel, W. (1978).** Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 133(2), 897–903.
- Biedendieck, R. (2006).** *Bacillus megaterium*: Versatile tools for production, secretion and purification of recombinant proteins. Dissertation. TU Braunschweig.
- Biedendieck, R., Borgmeier, C., Bunk, B., Stammen, S., Scherling, C., Meinhardt, F., Wittmann, C. & Jahn, D. (2011).** Systems biology of recombinant protein production using *Bacillus megaterium*. *Methods Enzymol*, 500, 165–195.
- Biedendieck, R., Gamer, M., Jaensch, L., Meyer, S., Rohde, M., Deckwer, W.-D. & Jahn, D. (2007a).** A sucrose-inducible promoter system for the intra- and extracellular protein production in *Bacillus megaterium*. *J Biotechnol*, 132(4), 426–430.

- Biedendieck, R., Yang, Y., Deckwer, W.-D., Malten, M. & Jahn, D. (2007b).** Plasmid system for the intracellular production and purification of affinity-tagged proteins in *Bacillus megaterium*. *Biotechnol Bioeng*, 96(3), 525–537.
- Bigger, J. (1944).** Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet*, 244(6320), 497–500.
- Binder, D., Grünberger, A., Loeschcke, A., Probst, C., Bier, C., Pietruszka, J., Wiechert, W., Kohlheyer, D., Jaeger, K.-E. & Drepper, T. (2014).** Light-responsive control of bacterial gene expression: precise triggering of the *lac* promoter activity using photocaged IPTG. *Integr Biol*, 6(8), 755.
- Boehm, A., Arnoldini, M., Bergmiller, T., Rösli, T., Bigosch, C. & Ackermann, M. (2016).** Genetic manipulation of glycogen allocation affects replicative lifespan in *E. coli*. *PLoS Genet*, 12(4), e1005974.
- Boros, I., Pósfai, G. & Venetianer, P. (1984).** High-copy-number derivatives of the plasmid cloning vector pBR322. *Gene*, 30(1-3), 257–260.
- Boyd, D., Weiss, D. S., Chen, J. C. & Beckwith, J. (2000).** Towards single-copy gene expression systems making gene cloning physiologically relevant: lambda InCh, a simple *Escherichia coli* plasmid-chromosome shuttle system. *J Bacteriol*, 182(3), 842–847.
- Branda, S. S., Chu, F., Kearns, D. B., Losick, R. & Kolter, R. (2006).** A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol*, 59(4), 1229–1238.
- Branda, S. S., González-Pastor, J. E., Ben-Yehuda, S., Losick, R. & Kolter, R. (2001).** Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(20), 11621–11626.
- Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P. & Hobman, J. L. (2003).** The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev*, 27(2–3), 145–163.
- Brückner, R. (1992).** A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene*, 122(1), 187–192.
- Burkholder, P. R. & Giles, N. H. (1947).** Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*. *Am J Bot*, 34(6), 345–348.
- Chai, Y., Chu, F., Kolter, R. & Losick, R. (2008).** Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 67(2), 254–263.
- Charlesworth, B. (1994).** Evolution in age-structured populations. Cambridge University Press, (pp. 1-61).

- Cheong, R., Paliwal, S. & Levchenko, A. (2010).** Models at the single cell level. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2(1), 34-48.
- Choy, H. & Adhya, S. (1996).** Negative control. In *Escherichia coli and Salmonella: Cell Mol Biol* (Neidhardt, F.C., et al., eds.), pp. 1287-1299, ASM Press, Washington, DC. Cleland, WW.
- Chung, J. D., Stephanopoulos, G., Ireton, K. & Grossman, A. D. (1994).** Gene expression in single cells of *Bacillus subtilis*: evidence that a threshold mechanism controls the initiation of sporulation. *J Bacteriol*, 176(7), 1977–1984.
- Christie, G., Götzke, H. & Lowe, C. R. (2010).** Identification of a receptor subunit and putative ligand-binding residues involved in the *Bacillus megaterium* QM B1551 spore germination response to glucose. *J Bacteriol*, 192(17), 4317–4326.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H. & Falkow, S. (1996).** FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173(1), 33–38.
- Crespi, B. J. (2001).** The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends Ecol Evol*, 16(4), 178–183.
- Dahl, M. K., Degenkolb, J. & Hillen, W. (1994).** Transcription of the *xyl* operon is controlled in *Bacillus subtilis* by tandem overlapping operators spaced by four base-pairs. *J Mol Biol*, 243(3), 413–424.
- Dahl, M. K., Schmiedel, D. & Hillen, W. (1995).** Glucose and glucose-6-phosphate interaction with Xyl repressor proteins from *Bacillus* spp. may contribute to regulation of xylose utilization. *J Bacteriol*, 177(19), 5467–5472.
- Davidson, C. J. & Surette, M. G. (2008).** Individuality in bacteria. *Annu Rev Genet*, 42(1), 253–268.
- De Bary, A. (1884).** Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen und Bakterien. Leipzig: Engelmann.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M. & Díaz-Orejas, R. (1998).** Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(2), 434–464.
- Deutscher, M. P. (2006).** Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Res*, 34(2), 659–666.
- Donnelly, C. E. & Reznikoff, W. S. (1987).** Mutations in the *lac* P2 promoter. *J Bacteriol*, 169(5), 1812–1817.

- Drepper, T., Krauss, U., Berstenhorst, S. M. zu, Pietruszka, J. & Jaeger, K.-E. (2011).** Lights on and action! Controlling microbial gene expression by light. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90(1), 23–40.
- Dubnau, D. & Losick, R. (2006).** Bistability in bacteria. *Mol Microbiol*, 61(3), 564–572.
- Ebright, R. H. (1993).** Transcription activation at Class I CAP-dependent promoters. *Mol Microbiol*, 8(5), 797–802.
- Ellermeier, C. D., Hobbs, E. C., Gonzalez-Pastor, J. E. & Losick, R. (2006).** A three-protein signaling pathway governing immunity to a bacterial cannibalism toxin. *Cell*, 124(3), 549–559.
- Elowitz, M. B., Levine, A. J., Siggia, E. D. & Swain, P. S. (2002).** Stochastic gene expression in a single cell. *Science*, 297(5584), 1183–1186.
- Foerster, H. F. & Foster, J. W. (1966).** Response of *Bacillus* spores to combinations of germinative compounds. *J Bacteriol*, 91(3), 1168–1177.
- Freed, N. E., Silander, O. K., Stecher, B., Böhm, A., Hardt, W.-D. & Ackermann, M. (2008).** A simple screen to identify promoters conferring high levels of phenotypic noise. *PLoS Genet*, 4(12).
- French, C. & Ward, J. M. (1996).** Production and modification of *E. coli* transketolase for large-scale biocatalysis. *Ann NY Acad Sci*, 799(1), 11–18.
- Friebs, K. (2004).** Plasmid copy number and plasmid stability. In T. Scheper (Ed.), *New Trends and Developments in Biochemical Engineering* (pp. 47–82).
- Gally, D. L., Hancock, I. C., Harwood, C. R. & Archibald, A. R. (1991).** Cell wall assembly in *Bacillus megaterium*: incorporation of new peptidoglycan by a monomer addition process. *J Bacteriol*, 173(8), 2548–2555.
- Gamer, M., Fröde, D., Biedendieck, R., Stammen, S. & Jahn, D. (2009).** A T7 RNA polymerase-dependent gene expression system for *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 82(6), 1195–1203.
- Gärtner, D., Degenkolb, J., Ripperger, J. A., Allmansberger, R. & Hillen, W. (1992).** Regulation of the *Bacillus subtilis* W23 xylose utilization operon: interaction of the Xyl repressor with the *xyl* operator and the inducer xylose. *Mol Gen Genet*, 232(3), 415–422.
- Gärtner, D., Geissendörfer, M. & Hillen, W. (1988).** Expression of the *Bacillus subtilis* *xyl* operon is repressed at the level of transcription and is induced by xylose. *J Bacteriol*, 170(7), 3102–3109.

- Gefen, O. & Balaban, N. Q. (2009).** The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiol Rev*, 33(4), 704–717.
- Geisler, N. & Weber, K. (1977).** Isolation of amino-terminal fragment of lactose repressor necessary for DNA binding. *Biochemistry*, 16(5), 938–943.
- González-Pastor, J. E. (2011).** Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev*, 35(3), 415–424.
- González-Pastor, J. E., Hobbs, E. C. & Losick, R. (2003).** Cannibalism by sporulating bacteria. *Science*, 301(5632), 510–513.
- Görke, B. & Stülke, J. (2008).** Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Micro*, 6(8), 613–624.
- Graumann, P. L. (2006).** Different genetic programmes within identical bacteria under identical conditions: the phenomenon of bistability greatly modifies our view on bacterial populations. *Mol Microbiol*, 61(3), 560–563.
- Gruber, S., Hagen, J., Schwab, H. & Koefinger, P. (2014).** Versatile and stable vectors for efficient gene expression in *Ralstonia eutropha* H16. *J Biotechnol*, 186(2014), 74–82.
- Grünberger, A., Wiechert, W. & Kohlheyer, D. (2014).** Single-cell microfluidics: opportunity for bioprocess development. *Curr Opin Biotechnol*, 29, 15–23.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S. & Minshull, J. (2004).** Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol*, 22(7), 346–353.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. (1995).** Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol*, 177(14), 4121–4130.
- Hahn, J., Kong, L. & Dubnau, D. (1994).** The regulation of competence transcription factor synthesis constitutes a critical control point in the regulation of competence in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 176(18), 5753–5761.
- Hamoen, L. W., Van Werkhoven, A. F., Bijlsma, J. J., Dubnau, D. & Venema, G. (1998).** The competence transcription factor of *Bacillus subtilis* recognizes short A/T-rich sequences arranged in a unique, flexible pattern along the DNA helix. *Genes Dev*, 12(10), 1539–1550.
- Harth, S. (2014).** Untersuchungen zur Kulturheterogenität in *Bacillus megaterium* durch die Erstellung neuer Vektorkonstrukte. Bachelorarbeit. TU Braunschweig.

- Hastrup, S. (1988).** Analysis of the *Bacillus subtilis* xylose regulon. *Genetics and Biotechnology of Bacilli*, 2, 79–83.
- Hayes, F. & Austin, S. (1994).** Topological scanning of the P1 plasmid partition site. *J Mol Biol*, 243(2), 190–198.
- Heldwein, E. E. & Brennan, R. G. (2001).** Crystal structure of the transcription activator BmrR bound to DNA and a drug. *Nature*, 409(6818), 378–382.
- Herbst, K. (2011).** The temperature- and growth phase-dependent regulation of the global virulence regulator RovA from *Yersinia pseudotuberculosis*. Dissertation. TU Braunschweig.
- Herzenberg, L. A. (1959).** Studies on the induction of beta-galactosidase in a cryptic strain of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 31(2), 525–538.
- Jahn, M., Günther, S. & Müller, S. (2015).** Non-random distribution of macromolecules as driving forces for phenotypic variation. *Curr Opin Microbiol*, 25, 49–55.
- Jahn, M., Seifert, J., von Bergen, M., Schmid, A., Bühler, B. & Müller, S. (2013).** Subpopulation-proteomics in prokaryotic populations. *Curr Opin Biotechnol*, 24(1), 79–87.
- Jahn, M., Vorpahl, C., Türkowsky, D., Lindmeyer, M., Bühler, B., Harms, H. & Müller, S. (2014).** Accurate determination of plasmid copy number of flow-sorted cells using droplet digital PCR. *Anal Chem*, 86(12), 5969–5976.
- Jain, A. & Srivastava, P. (2013).** Broad host range plasmids. *FEMS Microbiol Lett*, 348(2), 87–96.
- Kaltwasser, M., Wiegert, T. & Schumann, W. (2002).** Construction and application of epitope- and green fluorescent protein-tagging integration vectors for *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microb*, 68(5), 2624–2628.
- Kanaya, S. & Kudo, Y. (1991).** Specificity of promoter consensus sequences in *Escherichia coli* chromosome. *Nucleic Acids Symp Ser*, (25), 41–42.
- Kauder, C., Allmansberger, R., Gärtner, D., Schmiedel, D. & Hillen, W. (1993).** An operator binding-negative mutation of Xyl repressor from *Bacillus subtilis* is trans dominant in *Bacillus megaterium*. *FEMS Microbiol Lett*, 109(1), 81–84.
- Kearns, D. B. & Losick, R. (2005).** Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev*, 19(24), 3083–3094.
- Kell, D. B., Ryder, H. M., Kaprelyants, A. S. & Westerhoff, H. V. (1991).** Quantifying heterogeneity: flow cytometry of bacterial cultures. *A Van Leeuw J Microb*, 60(3-4), 145–158.

- Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N. & Lewis, K. (2004).** Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 186(24), 8172–8180.
- Khlebnikov, A., Risa, Ø., Skaug, T., Carrier, T. A. & Keasling, J. D. (2000).** Regulatable arabinose-inducible gene expression system with consistent control in all cells of a culture. *J Bacteriol*, 182(24), 7029–7034.
- Kieselburg, M. K., Weickert, M. & Vary, P. S. (1984).** Analysis of resident and transformant plasmids in *Bacillus megaterium*. *Nat Biotech*, 2(3), 254–259.
- Kittleson, J. T., Cheung, S. & Anderson, Jr. (2011).** Rapid optimization of gene dosage in *E. coli* using DIAL strains. *J Biol Eng*, 5, 10.
- Korneli, C., Biedendieck, R., David, F., Jahn, D. & Wittmann, C. (2013).** High yield production of extracellular recombinant levansucrase by *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97(8), 3343–3353.
- Kraus, A., Hueck, C., Gärtner, D. & Hillen, W. (1994).** Catabolite repression of the *Bacillus subtilis* *xyl* operon involves a cis element functional in the context of an unrelated sequence, and glucose exerts additional *xylR*-dependent repression. *J Bacteriol*, 176(6), 1738–1745.
- Kreuzer, P., Gärtner, D., Allmansberger, R. & Hillen, W. (1989).** Identification and sequence analysis of the *Bacillus subtilis* W23 *xylR* gene and *xyl* operator. *J Bacteriol*, 171(7), 3840–3845.
- Kück, P. D. U. (Ed.). (2005).** PCR-Analytik. In *Praktikum der Molekulargenetik* (pp. 221–245). Springer Berlin Heidelberg.
- Langreder, N. (2016).** Bestimmung der Plasmid-Kopienzahl und Einfluss unterschiedlicher Antibiotika bei der rekombinanten Proteinproduktion in *Bacillus megaterium*. Bachelorarbeit. TU Braunschweig.
- Lee, C., Kim, J., Shin, S. G. & Hwang, S. (2006).** Absolute and relative qPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 123(3), 273–280.
- Lemoigne, M., Lenoel, C. P. & Croson, M. (1950).** Assimilation of acetylacetic acid and beta-hydroxybutyric acid by *B. megatherium*. *Ann Inst Pasteur Mic*, 78(6), 705–710.
- Levy, S. F. (2016).** Cellular heterogeneity: benefits besides bet-hedging. *Curr Biol*, 26(9), R355–R357.
- Lewis, M., Chang, G., Horton, N. C., Kercher, M. A., Pace, H. C., Schumacher, M. A., Brennan, R. G. & Lu, P. (1996).** Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer. *Science*, 271(5253), 1247–1254.

- Lindner, A. B., Madden, R., Demarez, A., Stewart, E. J. & Taddei, F. (2008).** Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(8), 3076–3081.
- Lwoff, A. & Siminovitch, L. (1951).** Induction of lysis of a lysogenic bacterium without production of bacteriophages. *C R Hebd Seances Acad Sci*, 233(22), 1397–1399.
- Lwoff, A., Siminovitch, L. & Kjeldgaard, N. (1950).** Induction of the production of bacteriophages in lysogenic bacteria. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 79:815–859.
- Maamar, H. & Dubnau, D. (2005).** Bistability in the *Bacillus subtilis* K-state (competence) system requires a positive feedback loop. *Mol Microbiol*, 56(3), 615–624.
- Maddock, J. R. & Shapiro, L. (1993).** Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science*, 259(5102), 1717–1723.
- Makrides, S. C. (1996).** Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, 60(3), 512–538.
- Maloney, P. C. & Rotman, B. (1973).** Distribution of suboptimally induces -D-galactosidase in *Escherichia coli*. The enzyme content of individual cells. *J Mol Biol*, 73(1), 77–91.
- Malten, M., Hollmann, R., Deckwer, W.-D. & Jahn, D. (2005).** Production and secretion of recombinant *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase DsrS in *Bacillus megaterium*. *Biotechnol Bioeng*, 89(2), 206–218.
- Martínez-Antonio, A. & Collado-Vides, J. (2003).** Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 6(5), 482–489.
- Mayer, M. P. (1995).** A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene*, 163(1), 41–46.
- Mieschendahl, M., Büchel, D., Bocklage, H. & Müller-Hill, B. (1981).** Mutations in the *lacY* gene of *Escherichia coli* define functional organization of lactose permease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78(12), 7652–7656.
- Miller, J. H. (1972).** Experiments in molecular genetics. [Cold Spring Harbor, N.Y.]: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Mirel, D. B. & Chamberlin, M. J. (1989).** The *Bacillus subtilis* flagellin gene (*hag*) is transcribed by the sigma 28 form of RNA polymerase. *J Bacteriol*, 171(6), 3095–3101.

- Miroux, B. & Walker, J. E. (1996).** Over-production of proteins in *Escherichia coli*: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*, 260(3), 289–298.
- Mitarai, N., Jensen, M. H. & Semsey, S. (2015).** Coupled positive and negative feedbacks produce diverse gene expression patterns in colonies. *mBio*, 6(2), e00059-15.
- Mitrophanov, A. Y. & Groisman, E. A. (2008).** Positive feedback in cellular control systems. *BioEssays*, 30(6), 542–555.
- Monod, J. (1941).** Recherches sur la croissance des cultures bactérienne. Hermann, Paris, (pp. 1-137).
- Monod, M., Denoya, C. & Dubnau, D. (1986).** Sequence and properties of pIM13, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance plasmid from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 167(1), 138–147.
- Morgan-Kiss, R. M., Wadler, C. & Cronan, J. E. (2002).** Long-term and homogeneous regulation of the *Escherichia coli* *araBAD* promoter by use of a lactose transporter of relaxed specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(11).
- Moyed, H. S. & Bertrand, K. P. (1983).** HipA, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol*, 155(2), 768–775.
- Mrak, P., Podlesek, Z., Putten, J. P. M. van & Žgur-Bertok, D. (2007).** Heterogeneity in expression of the *Escherichia coli* colicin K activity gene *cka* is controlled by the SOS system and stochastic factors. *Mol Genet Genomics*, 277(4), 391–401.
- Müller-Hill, B. (1996).** The *lac operon*: A short history of a genetic paradigm. Walter de Gruyter, (pp. 1-5).
- Müller, A. K., Rojo, F. & Alonso, J. C. (1995).** The level of the pUB110 replication initiator protein is autoregulated, which provides an additional control for plasmid copy number. *Nucleic Acids Res*, 23(11), 1894–1900.
- Müller, J., van Dijl, J. M., Venema, G. & Bron, S. (1996).** Cloning of heterologous genes specifying detrimental proteins on pUC-derived plasmids in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet: MGG*, 252(1–2), 207–211.
- Münch, K. M., Müller, J., Wienecke, S., Bergmann, S., Heyber, S., Biedendieck, R., Münch, R. & Jahn, D. (2015).** Polar fixation of plasmids during recombinant protein production in *Bacillus megaterium* results in population heterogeneity. *Appl Environ Microb*, 81(17), 5976–5986.

- Narang, A. (2007).** Effect of DNA looping on the induction kinetics of the *lac operon*. *J Theor Biol*, 247(4), 695–712.
- Narang, A. & Pilyugin, S. S. (2008).** Bistability of the *lac operon* during growth of *Escherichia coli* on lactose and lactose + glucose. *Bull Math Biol*, 70(4), 1032–1064.
- Ni, L., Tonthat, N. K., Chinnam, N. & Schumacher, M. A. (2013).** Structures of the *Escherichia coli* transcription activator and regulator of diauxie, XylR: an AraC DNA-binding family member with a LacI/GalR ligand-binding domain. *Nucleic Acids Res*, 41(3), 1998–2008.
- Novick, A. & Weiner, M. (1957).** Enzyme induction as an all-or-none phenomenon. *Proc Natl Acad Sci USA*, 43(7), 553–566.
- Okibe, N., Suzuki, N., Inui, M. & Yukawa, H. (2013).** pCGR2 copy number depends on the par locus that forms a ParC-ParB-DNA partition complex in *Corynebacterium glutamicum*. *J Appl Microbiol*, 115(2), 495–508.
- Overkamp, W., Beilharz, K., Weme, R. D. O., Solopova, A., Karsens, H., Kovács, Á. T., Kok, J., Kuipers, O. P. & Veening, J.-W. (2013).** Benchmarking various green fluorescent protein variants in *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Lactococcus lactis* for live cell imaging. *Appl Environ Microb*, 79(20), 6481–6490.
- Overton, T. W. (2014).** Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today*, 19(5), 590–601.
- Patterson, K. G. (2009).** Gene regulation in the *lac operon*, Bibliothekskatalog scholarworks.montana.edu, 1-169.
- Peredelchuk, M. Y. & Bennett, G. N. (1997).** A method for construction of *E. coli* strains with multiple DNA insertions in the chromosome. *Gene*, 187(2), 231–238.
- Philippi, T. & Seger, J. (1989).** Hedging one's evolutionary bets, revisited. *Trends Ecol Evol*, 4(2), 41–44.
- Pinto, U. M., Pappas, K. M. & Winans, S. C. (2012).** The ABCs of plasmid replication and segregation. *Nat Rev Micro*, 10(11), 755–765.
- Priest, F. G., Goodfellow, M. & Todd, C. (1988).** A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J Gen Microbiol*, 134(7), 1847–1882.
- Ratcliff, W. C. & Denison, R. F. (2010).** Individual-level bet hedging in the bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Curr Biol*, 20(19), 1740–1744.

- Ratcliff, W. C. & Denison, R. F. (2011).** Bacterial persistence and bet hedging in *Sinorhizobium meliloti*. *Commun Integr Biol*, 4(1), 98–100.
- Record, M. T. Jr, Reznikoff, W. S., Craig, M. L., McQuade, K. L. & Schlaz, P. J. (1996).** *Escherichia coli* RNA polymerase ($E\sigma^{70}$), promoters, and the kinetics of the steps of transcription initiation. Ed Neidhardt FC (ASM Press, Washington, D.C.) 2nd Ed, (pp. 792–820).
- Reyes-Lamothe, R., Tran, T., Meas, D., Lee, L., Li, A. M., Sherratt, D. J. & Tolmasky, M. E. (2014).** High-copy bacterial plasmids diffuse in the nucleoid-free space, replicate stochastically and are randomly partitioned at cell division. *Nucleic Acids Res*, 42(2), 1042–1051.
- Roth, A. (2005).** Mannitolproduktion im rekombinanten *Bacillus megaterium*. Diplomarbeit. TU Braunschweig.
- Rygus, T. & Hillen, W. (1991).** Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon. *Appl Microbiol Biochnolt*, 35(5), 594-599.
- Rygus, T. & Hillen, W. (1992).** Catabolite repression of the *xyl* operon in *Bacillus megaterium*. *J Bacteriol*, 174(9), 3049–3055.
- Rygus, T., Scheler, A., Allmansberger, R. & Hillen, W. (1991).** Molecular cloning, structure, promoters and regulatory elements for transcription of the *Bacillus megaterium* encoded regulon for xylose utilization. *Arch Microbiol*, 155(6), 535–542.
- Saiz, L. & Vilar, J. M. G. (2008).** Ab initio thermodynamic modeling of distal multisite transcription regulation. *Nucleic Acids Res*, 36(3), 726–731.
- Sambrook, J. & Russel, D. (2001).** Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor NY USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scheler, A. & Hillen, W. (1993).** Glucose is an anti-inducer for the *Bacillus licheniformis* encoded Xyl repressor. *FEMS Microbiol Lett*, 107(2-3), 299–302.
- Scheler, A., Rygus, T., Allmansberger, R. & Hillen, W. (1991).** Molecular cloning, structure, promoters and regulatory elements for transcription of the *Bacillus licheniformis* encoded regulon for xylose utilization. *Arch Microbiol*, 155(6), 526–534.
- Scheler, A. & Hillen, W. (1994).** Regulation of xylose utilization in *Bacillus licheniformis*: Xyl repressor-*xyl*-operator interaction studied by DNA modification protection and interference. *Mol Microbiol*, 13(3), 505–512.

- Schlax, P. J., Capp, M. W. & Record, M. T. (1995).** Inhibition of transcription initiation by Lac repressor. *J Mol Biol*, 245(4), 331–350.
- Schmiedel, D., Kintrup, M., Küster, E. & Hillen, W. (1997).** Regulation of expression, genetic organization and substrate specificity of xylose uptake in *Bacillus megaterium*. *Mol Microbiol*, 23(5), 1053–1062.
- Schmitz, A. & Galas, D. J. (1979).** The interaction of RNA polymerase and lac repressor with the *lac* control region. *Nucleic Acids Res*, 6(1), 111–137.
- Sharp, P. M. & Li, W. H. (1987).** The codon Adaptation Index - A measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res*, 15(3), 1281–1295.
- Siegele, D. A. & Hu, J. C. (1997).** Gene expression from plasmids containing the *araBAD* promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(15), 8168–8172.
- Skerker, J. M. & Laub, M. T. (2004).** Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Nat Rev Microbiol*, 2(4), 325–337.
- Smits, W. K., Kuipers, O. P. & Veening, J.-W. (2006).** Phenotypic variation in bacteria: the role of feedback regulation. *Nat Rev Micro*, 4(4), 259–271.
- Song, S. & Park, C. (1997).** Organization and regulation of the D-xylose operons in *Escherichia coli* K-12: XylR acts as a transcriptional activator. *J Bacteriol*, 179(22), 7025–7032.
- Stammen, S., Müller, B. K., Korneli, C., Biedendieck, R., Gamer, M., Franco-Lara, E. & Jahn, D. (2010).** High-yield intra- and extracellular protein production using *Bacillus megaterium*. *Appl Environ Microb*, 76(12), 4037–4046.
- Stewart, E. J., Madden, R., Paul, G. & Taddei, F. (2005).** Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. *PLOS Biol*, 3(2), e45.
- Stoebel, D. M., Dean, A. M. & Dykhuizen, D. E. (2008).** The cost of expression of *Escherichia coli lac* operon proteins is in the process, not in the products. *Genetics*, 178(3), 1653–1660.
- Straney, S. B. & Crothers, D. M. (1987).** Lac repressor is a transient gene-activating protein. *Cell*, 51(5), 699–707.
- Striedner, G., Cserjan-Puschmann, M., Pötschacher, F. & Bayer, K. (2003).** Tuning the transcription rate of recombinant protein in strong *Escherichia coli* expression systems through repressor titration. *Biotechnol Progress*, 19(5), 1427–1432.

- Süel, G. M., Garcia-Ojalvo, J., Liberman, L. M. & Elowitz, M. B. (2006).** An excitable gene regulatory circuit induces transient cellular differentiation. *Nature*, 440(7083), 545–550.
- Swain, P. S., Elowitz, M. B. & Siggia, E. D. (2002).** Intrinsic and extrinsic contributions to stochasticity in gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(20), 12795–12800.
- Swint-Kruse, L. & Matthews, K. S. (2009).** Allostery in the LacI/GalR family: variations on a theme. *Curr Opin in Microbiol*, 12(2), 129–137.
- Titgemeyer, F., Reizer, J., Reizer, A. & Saier, M. H. (1994).** Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria. *Microbiology*, 140(9), 2349–2354.
- Titok, M. A., Chapuis, J., Selezneva, Y. V., Lagodich, A. V., Prokulevich, V. A., Ehrlich, S. D. & Janni re, L. (2003).** *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid replicon analysis and construction of a new theta-replicating vector. *Plasmid*, 49(1), 53–62.
- Valentin-Hansen, P., S gaard-Andersen, L. & Pedersen, H. (1996).** A flexible partnership: the CytR anti-activator and the cAMP-CRP activator protein, comrades in transcription control. *Mol Microbiol*, 20(3), 461–466.
- Vary, P. (1992).** Development of genetic engineering in *Bacillus megaterium*. *Biotechnology*, 22, 251–310.
- Vary, P. S. (1994).** Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology*, 140(5), 1001–1013.
- Vary, P. S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W.-D. & Jahn, D. (2007).** *Bacillus megaterium*--from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76(5), 957–967.
- Weisblum, B., Graham, M. Y., Gryczan, T. & Dubnau, D. (1979).** Plasmid copy number control: isolation and characterization of high-copy-number mutants of plasmid pE194. *J Bacteriol*, 137(1), 635–643.
- Wettmann, L., Bonny, M. & Kruse, K. (2014).** Effects of molecular noise on bistable protein distributions in rod-shaped bacteria. *Interface Focus*, 4(6), 20140039.
- Wiacek, C., M ller, S. & Benndorf, D. (2006).** A cytomic approach reveals population heterogeneity of *Cupriavidus necator* in response to harmful phenol concentrations. *Proteomics*, 6(22), 5983–5994.
- Wilkie, K. C. B. & Woo, S. L. (1977).** Heteroxylan and hemicellulosic materials from bamboo leaves, and a reconsideration of the general nature of commonly occurring xylans and other hemicelluloses. *Carbohydr Res*, 57, 145–162.

- Winkler, J., Seybert, A., König, L., Pruggnaller, S., Haselmann, U., Sourjik, V., Weiss, M., Frangakis, A.S., Mogk, A. & Bukau, B. (2010).** Quantitative and spatio-temporal features of protein aggregation in *Escherichia coli* and consequences on protein quality control and cellular ageing. *EMBO J*, 29(5), 910–923.
- Wittchen, K.-D. & Meinhardt, F. (1995).** Inactivation of the major extracellular protease from *Bacillus megaterium* DSM319 by gene replacement. *Appl Microbiol Biotechnol*, 42(6), 871–877.
- Wösten, M. M. (1998).** Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev*, 22(3), 127–150.
- Xu, J. & Matthews, K. S. (2009).** Flexibility in the inducer binding region is crucial for allostery in the *Escherichia coli* lactose repressor. *Biochemistry*, 48(22), 4988–4998.
- Yang, Y., Biedendieck, R., Wang, W., Gamer, M., Malten, M., Jahn, D. & Deckwer, W.-D. (2006).** High yield recombinant penicillin G amidase production and export into the growth medium using *Bacillus megaterium*. *Microb Cell Fact*, 5, 36.
- Yang, Y., Malten, M., Grote, A., Jahn, D. & Deckwer, W.-D. (2007).** Codon optimized *Thermobifida fusca* hydrolase secreted by *Bacillus megaterium*. *Biotechnol Bioeng*, 96(4), 780–794.
- Young, J. W., Locke, J. C. W., Altinok, A., Rosenfeld, N., Bacarian, T., Swain, P. S., Mjolsness, E. & Elowitz, M. B. (2012).** Measuring single-cell gene expression dynamics in bacteria using fluorescence time-lapse microscopy. *Nature Protocols*, 7(1), 80–88.

9. ANHANG

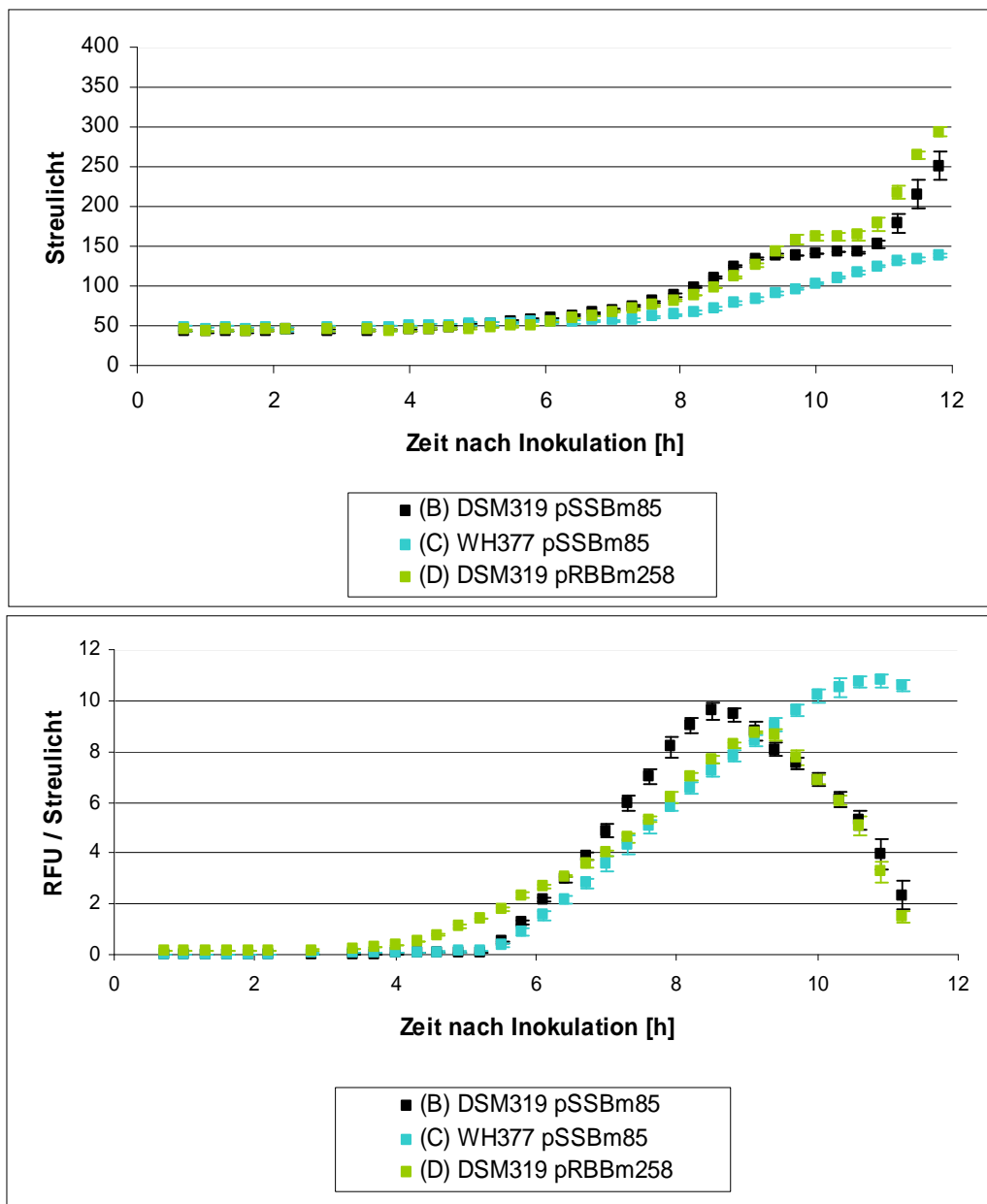


Abb. 37: Wachstumskurve (oben) und Gfp-Quantifizierung (unten) von *B. megaterium* transformiert mit DSM319 pSSBm85 (Referenzstamm), WH377 (*xyIT*-Mutante) transformiert mit pSSBm85 und DSM319 transformiert mit pRBBm258 (Expressionssystem mit konstitutivem Promotor). Die *B. megaterium*-Stämme wurden bei 37 °C und 1400 rpm in 1 mL Tet-A5+4-Medium im BioLector kultiviert. Alle 18 Minuten nach Inokulation erfolgte die Bestimmung der Biomasse mittels Streulicht (620 nm) und die Quantifizierung von Gfp bei 486 nm (RFU) durch den BioLector. Die Induktion erfolgte 4 h nach Inokulation mit 0,5 % (w/v) Xylose (außer DSM319 transformiert mit pRBBm258). Die Kurven stellen den Mittelwert aus Triplikaten dar. Die Buchstaben vor den Stamm-Namen in der Legende stellen die Reihen der Histogramme in der Durchflusszytometrie (Kapitel 4.2.1.1**) dar. Die Wachstumskurve (oben; B, D) zeigten ein diauxisches Verhalten, was jedoch lediglich auf Effekte wie Zellyse oder morphologische Zellveränderungen zurückzuführen war. Außerdem zeigte der Stamm WH377 transformiert mit pSSBm85 ein geringes Wachstum (oben; C), was im Zusammenhang mit einer hohen Gfp-Produktion stehen könnte (unten; C). Im Vergleich dazu zeigte WH377 transformiert mit pSSBm85 ohne Induktion 12 h nach Inokulation ein 2-fach höheres Wachstum (Kurve nicht gezeigt).**

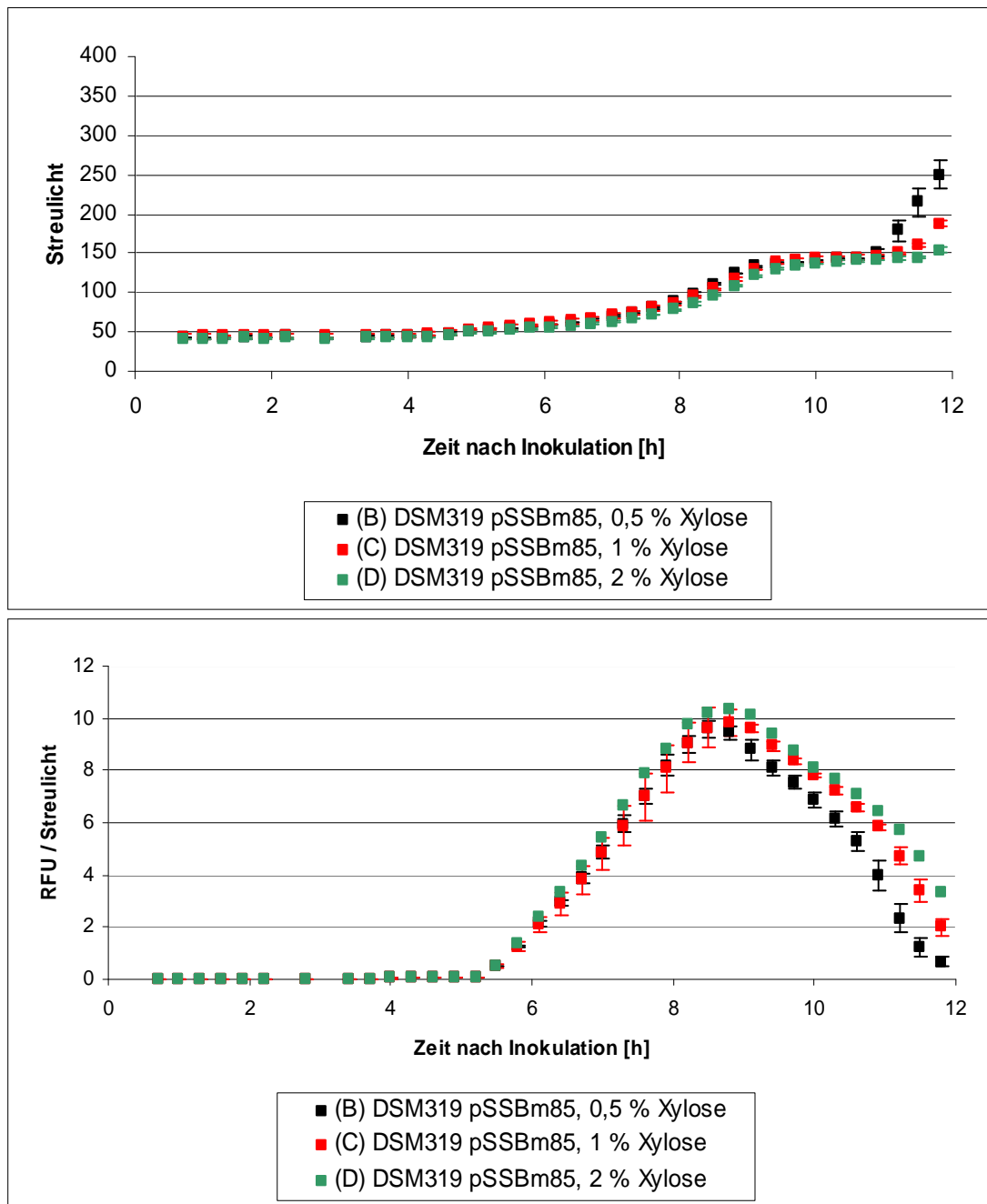


Abb. 38: Wachstumskurve (oben) und Gfp-Quantifizierung (unten) von *B. megaterium* DSM319 transformiert mit pSSBm85 mit unterschiedlicher Induktorkonzentration. Die *B. megaterium*-Stämme wurden bei 37 °C und 1400 rpm in 1 mL Tet-A5+4-Medium im BioLector kultiviert. Alle 18 Minuten nach Inokulation erfolgte die Bestimmung der Biomasse mittels Streulicht (620 nm) und die Quantifizierung von Gfp bei 486 nm (RFU) durch den BioLector. Die Induktion erfolgte 5 h nach Inokulation mit 0,5, 1 und 2 % (w/v) Xylose. Die Kurven stellen den Mittelwert aus Triplikaten dar. Die Buchstaben vor den Stamm-Namen in der Legende stellen die Reihen der Histogramme in der Durchflusszytometrie (**Kapitel 4.2.2.1**) dar. Die Wachstumskurve (oben; B, C und D) zeigte ein diauxisches Verhalten, was jedoch lediglich auf Effekte wie Zelllyse oder morphologische Zellveränderungen zurückzuführen war.

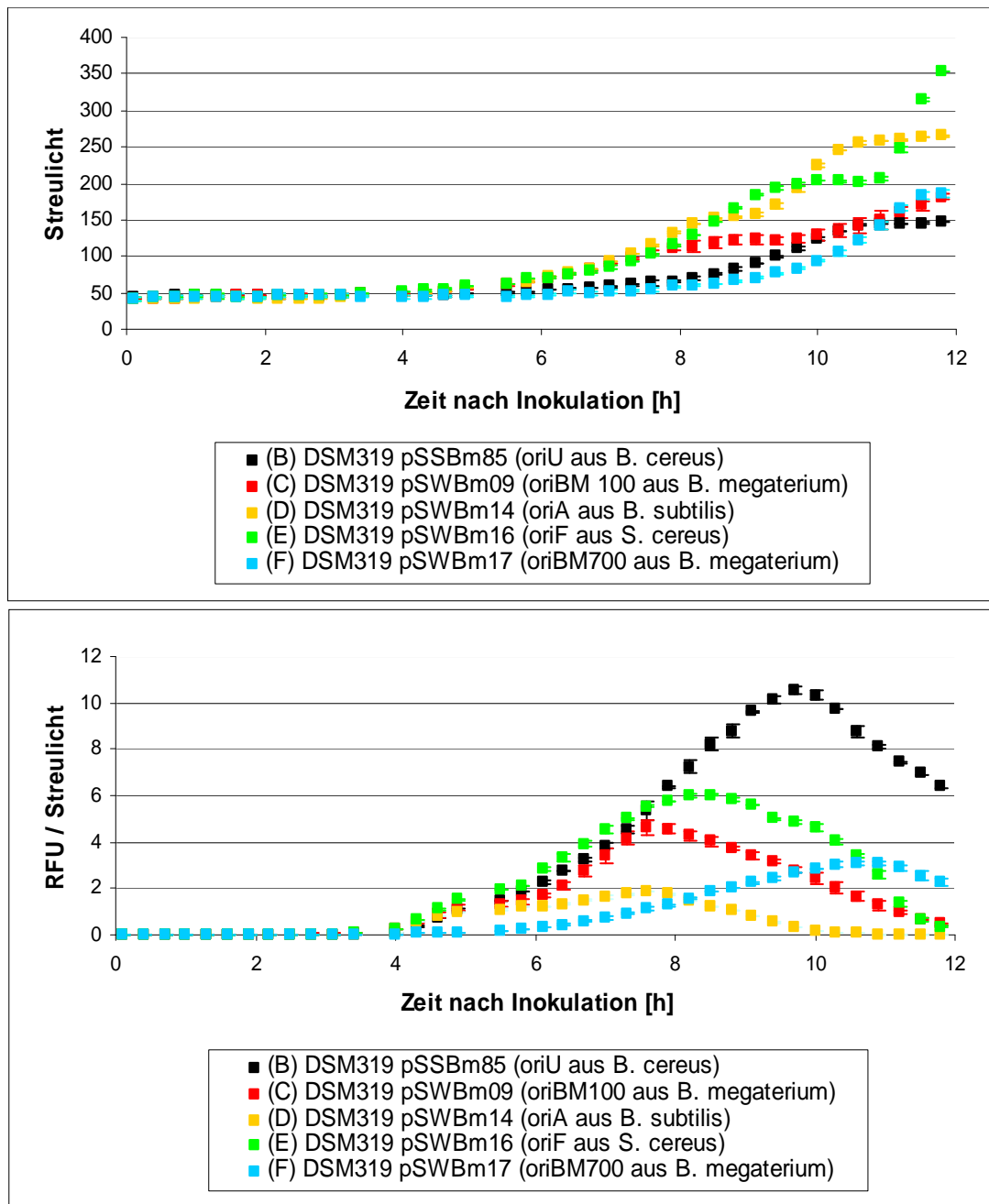


Abb. 39: Wachstumskurve (oben) und Gfp-Quantifizierung (unten) von *B. megaterium* DSM319 mit Plasmiden, die unterschiedliche *ori*-Konstrukte enthalten. Die *B. megaterium*-Stämme wurden bei 37 °C und 1400 rpm in 1 mL Tet-A5+4-Medium im BioLector kultiviert. Alle 18 Minuten nach Inokulation erfolgte die Bestimmung der Biomasse mittels Streulicht (620 nm) und die Quantifizierung von Gfp bei 486 nm (RFU) durch den BioLector. Die Induktion erfolgte 4 h nach Inokulation mit 0,5 % (w/v) Xylose. Die Kurven stellen den Mittelwert aus Triplikaten dar. Die Buchstaben vor den Stamm-Namen in der Legende stellen die Reihen der Histogramme in der Durchflusszytometrie (**Kapitel 4.2.2.2**) dar. Die Wachstumskurven (oben; C, D, E) zeigten ein diauxisches Verhalten, was jedoch lediglich auf Effekte wie Zelllyse oder morphologische Zellveränderungen zurückzuführen war.

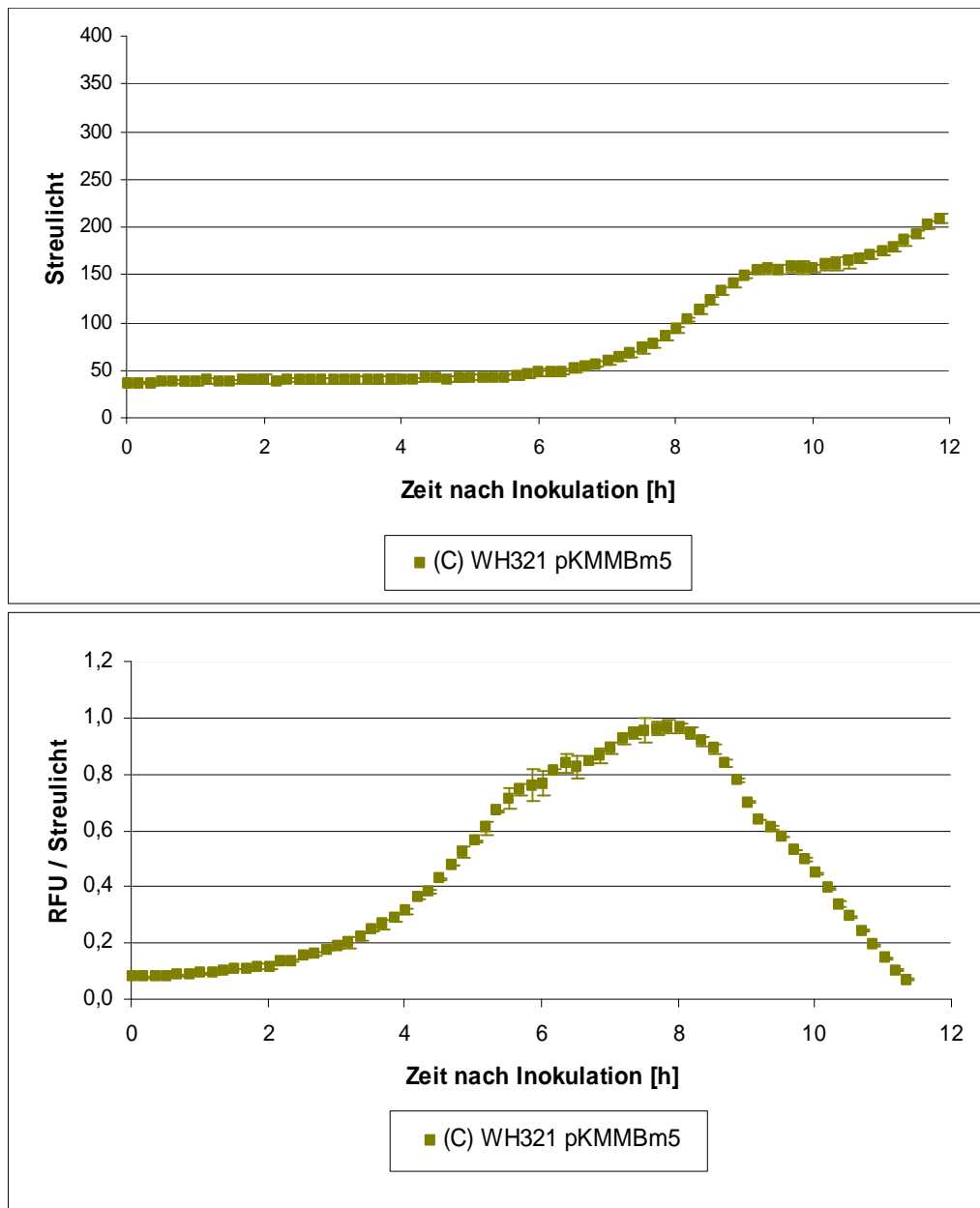


Abb. 40: Wachstumskurve (oben) und Gfp-Quantifizierung (unten) der *B. megaterium* *xyIR*-Mutante WH321 transformiert mit pKMMBm5. Der *B. megaterium*-Stamm wurde bei 37 °C und 1400 rpm in 1 mL Tet-A5+4-Medium im BioLector kultiviert. Alle 18 Minuten nach Inokulation erfolgte die Bestimmung der Biomasse mittels Streulicht (620 nm) und die Quantifizierung von Gfp bei 486 nm (RFU) durch den BioLector. Die Kurven stellen den Mittelwert aus Triplikaten dar. Die Buchstaben vor den Stamm-Namen in der Legende stellen die Reihen der Histogramme in der Durchflusszytometrie (**Kapitel 4.2.2.3**) dar. Da sich das Wachstumsverhalten und die Gfp-Produktion stark vom Vergleichstamm DSM319 transformiert mit pSSBm85 unterschied, wurde auf die gemeinsame Darstellung verzichtet, um die Stauchung der y-Werte von WH321 transformiert mit pKMMBm5 zu vermeiden. Die Tendenz von Wachstumsverhalten und Gfp-Produktion von DSM319 transformiert mit pSSBm85 können aus den vorherigen Abbildungen entnommen werden.

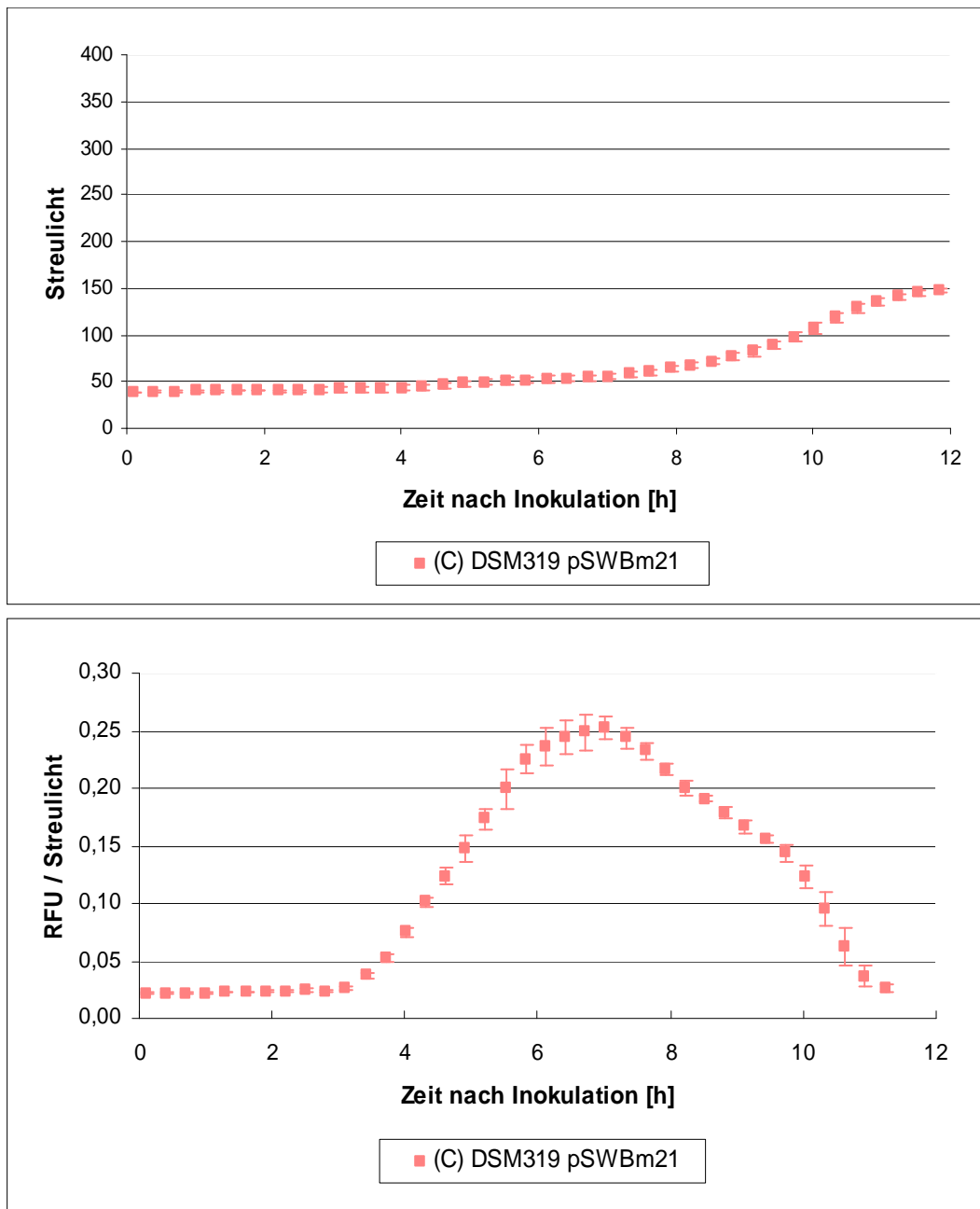


Abb. 41: Wachstumskurve (oben) und Gfp-Quantifizierung (unten) von *B. megaterium* DSM319 transformiert mit pSWBm21 mit instabilem Gfp (P_{xyIA}^{-} -egfp-LVA). Der *B. megaterium*-Stamm wurde bei 37 °C und 1400 rpm in 1 mL Tet-A5+4-Medium im BioLector kultiviert. Alle 18 Minuten nach Inokulation erfolgte die Bestimmung der Biomasse mittels Streulicht (620 nm) und die Quantifizierung von Gfp bei 486 nm (RFU) durch den BioLector. Die Induktion erfolgte 3 h nach Inokulation mit 0,5 % (w/v) Xylose. Die Kurven stellen den Mittelwert aus Triplikaten dar. Die Buchstaben vor den Stamm-Namen in der Legende stellen die Reihen der Histogramme in der Durchflusszytometrie (**Kapitel 4.2.3.1**) dar. Da sich das Wachstumsverhalten und die Gfp-Produktion stark vom Vergleichstamm DSM319 transformiert mit pSSBm85 unterschied, wurde auf die gemeinsame Darstellung verzichtet, um die Stauchung der y-Werte von DSM319 transformiert mit pSWBm21 zu vermeiden. Die Tendenz von Wachstumsverhalten und Gfp-Produktion von DSM319 transformiert mit pSSBm85 können aus den vorherigen Abbildungen entnommen werden.

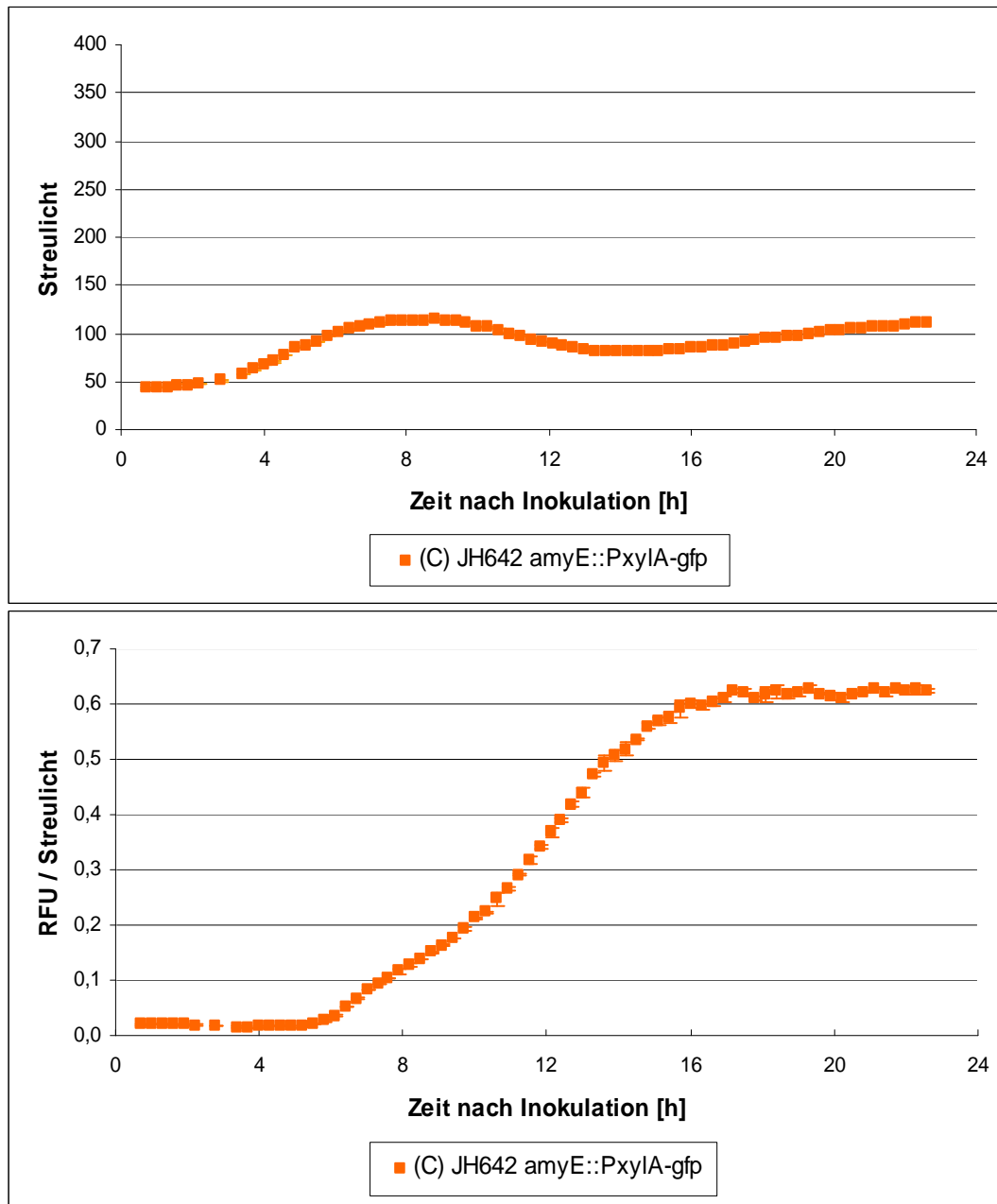


Abb. 42: Wachstumskurve (oben) und Gfp-Quantifizierung (unten) der *B. subtilis* P_{xylA} -gfp Integrationsmutante JH642 amyE:: P_{xylA} -gfp. Der *B. subtilis*-Stamm wurde bei 37 °C und 1400 rpm in 1 mL A5+4-Medium im BioLector kultiviert. Alle 18 Minuten nach Inokulation erfolgte die Bestimmung der Biomasse mittels Streulicht (620 nm) und die Quantifizierung von Gfp bei 486 nm (RFU) durch den BioLector. Die Induktion erfolgte 3 h nach Inokulation mit 0,5 % (w/v) Xylose. Die Kurven stellen den Mittelwert aus Triplikaten dar. Die Buchstaben vor den Stamm-Namen in der Legende stellen die Reihen der Histogramme in der Durchflusszytometrie (**Kapitel 4.2.3.4**) dar. Da sich das Wachstumsverhalten und die Gfp-Produktion stark vom Vergleichstamm DSM319 transformiert mit pSSBm85 unterschied, wurde auf die gemeinsame Darstellung verzichtet, um die Stauchung der y-Werte von JH642 amyE:: P_{xylA} -gfp zu vermeiden. Die Tendenz von Wachstumsverhalten und Gfp-Produktion von DSM319 transformiert mit pSSBm85 können aus den vorherigen Abbildungen entnommen werden.

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn **Prof Dr. Dieter Jahn** für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis anfertigen zu können, für motivierende Gespräche und vorallem für die hilfreichen Tipps bei Footprint-Analysen.

Außerdem bedanke ich mich bei **Frau Dr. Simone Bergmann** für die Übernahme des Korreferats, aber auch besonders für die wirklich ständige Bereitschaft, mir bei allen Fragen rundum Durchflussszytometrie und Mikroskopie mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Zudem danke ich Herrn **Prof. Dr. Stefan Dübel** für die freundliche Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Mein herzlichster Dank gilt **Frau Dr. Rebekka Biedendieck**. Liebe Rebi, ich danke dir für deine ständige Unterstützung, deine Motivation und Energie, die einfach immer ansteckend war. Ich danke dir für deinen großen Einsatz, nicht nur für mich, sondern auch für deine ganze Arbeitsgruppe. Ich danke dir für die Mühe, Sorgfältigkeit, Genauigkeit und die viele Zeit, die auch du in diese Arbeit gesteckt hast. Danke, für die schöne Zeit und für all das, was ich in den letzten sieben Jahren von dir lernen durfte. Ohne dein Vertrauen und den Mut, den du mir vermittelt hast, würde es diese Arbeit nicht geben.

Außerdem möchte ich meinen ehemaligen Lieblingslaborkollegen, **Dr. Tobias Knuuti** und **Dr. Constanze Finger**, ganz lieb danken. Unsere Zeit im Biozentrum wird mir immer in guter Erinnerung bleiben. Nicht nur fachlich habe ich die Zusammenarbeit mit euch sehr genossen. Danke, für die vielen Dinge, die ich von euch lernen konnte. Besonderer Dank gilt auch eurer Unterstützung und Hilfe am Anfang meiner Promotion, mit der ich für die „neuen Aufgaben“ bestens vorbereitet war. Tobi, ich freue mich sehr, dass du nun mein alter „neuer Kollege“ bist!

Zusätzlich möchte ich mich auch bei meinen Bachelorstudenten **Simon Harth, Mareike Tippe, Lisa Plötzky, Kristin Hauschild** und **Nora Langreder** sowie meinen Praktikanten **Ronja, Lisa, Nikola, Maren & Michelle, Oliver & Melanie, Anna & Lina** sowie **Erik** bedanken, die eine große Bereicherung für verschiedene Projekte waren.

Dann möchte ich vier ganz lieben Personen aus dem Institut danken, die mir im Laufe der Zeit besonders ans Herz gewachsen sind und deren Bekanntschaft ich nicht missen möchte. Danke **Ivana Blazenovic, Mareike Berges, Simone Thiel** und **Lisa Plötzky** für eure Unterstützung in allen Lebenslagen! Aber vorallem für viele lustige Momente, gute Gespräche und den Spaß, den wir gemeinsam hatten! Lisa, danke für die gute und reichhaltige Verpflegung und dass du immer aufgepasst hast, dass ich nicht vom Fleisch falle! Mareike, danke, dass du das mit viel Obst ausgeglichen hast ☺. Unser gemeinsames Büro fehlt mir jetzt schon!

Zudem möchte ich einigen Leuten aus dem Institut ganz besonders danken, die mit ihrem fachlichen Wissen und ihrer Hilfsbereitschaft auch zu dieser Arbeit beigetragen haben. Ich danke **Dr. Elisabeth Härtig, Maren Behringer** und **Matthias Ebert** für die Hilfe und Diskussionen über meine DNA-Bindestudien. Ganz besonders aber danke ich der lieben **Anja Hartmann**, die mir (gefühlte 1000) wunderschöne, luftblasenfreie Footprintgele gegossen hat! Bei **Dr. Richard Münch** möchte ich mich für die Hilfe bei den Time lapse-Aufnahmen bedanken. Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei **Hilger Jagau**, der mich bei der Mikroskopie immer tatkräftig unterstützt hat.

Bei meiner Kooperationspartnerin, **Sabine Buchmeier**, möchte ich mich für ganz tolle Antikörper bedanken!

Außerdem danke ich natürlich auch dem ganzen Rest des **Institutes für Mikrobiologie** für die viele Hilfsbereitschaft und die Freundlichkeit, die mir immer entgegengebracht wurde. Besonderer Dank gilt auch den „guten Seelen des Hauses“: **Herrn Hoppe, Daniela Schnobel, Christina Nitzsche, Gunhild Voß, Dagmar Rose** und **Barbara Cwiklinski**. Danke, dass ich mich immer auf euch verlassen konnte.

Mein größter Dank gilt meinen lieben **Eltern** und meiner ganzen **Familie**. Danke, für eure liebe Fürsorge, euren guten Zuspruch und euer Interesse, an dem was ich tue. Danke, für eure Unterstützung und dass auch ihr diese Arbeit möglich gemacht habt. Meiner **Schwester Laura** danke ich für die Hilfe mit meinem kaputten Laptop ☺. Außerdem danke ich meinen **engsten Freunden**, die ich während meiner Studienzeit in Braunschweig kennengelernt habe. Danke Janina, Richarda, Patrik und Bernd, dass ihr mich immer bestärkt habt! Ihr seid die Besten!

Den letzten, und für mich wichtigsten Satz, möchte ich meinem lieben Papa widmen, bei dem ich mich einmal bedanken möchte, für all das, was er für seine vier Kinder tut und möglich macht und ohne den diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre.